

P9500689

KÖZZÉTÉTELI PÉLDÁNY

7336

60418/ZE

72926

Nagy molekulatömegű deszulfato-hirudin

CIBA-GEIGY AG, BÁZEL, SVÁJC

2

A bejelentés napja: 1995.03.07.

Elsőbbsége: 1993.08.04. /93810552.5/ EURÓPA

Kivonat

A találmány trombininhibitorok területére vonatkozik, és módosított deszulfato-hirudinok, különösen olyan deszulfato-hirudinok előállítását mutatja be, melyek géntechnológia segítségével készülnek. A találmány tárgyát képezi továbbá olyan módszer biztosítása, amely a módosított deszulfato-hirudint biológiailag aktív trombininhibitorrá, valamint két vagy több nevezett deszulfato-hirudin keverékét nagyobb molekulatömegű trombininhibitorokká denaturálja és renaturálja.

jelentés a bejelentés
be

P9500689

KÖZZÉTÉTELI PÉLDÁNY

70000

S.B.G. & K.

Nemzetközi
Szabadalmi Iroda

"A"

60.418/ZE

H-1062 Budapest, Andrásy út 113.
Telefon: 34-24-950, Fax: 34-24-323

Nagy molekulatömegű deszulfato-hirudin

CIBA-GEIGY AG, BÁZEL, SVÁJC

A bejelentés napja: 1995.03.07.

Elsőbbsége: 1993.08.04. /93810552.5/ EURÓPA

A találmány trombininhibitorok területére vonatkozik, és módosított hirudinok, különösen olyan deszulfato-hirudin-muteinek előállítását írja le, melyek géntechnológia segítségével készülnek. A találmány tárgyát képezi továbbá olyan módszer biztosítása, mellyel nevezett hirudinok 2-4 monomerjének keverékéből biológiailag aktív, nagy molekulatömegű hirudint állítanak elő.

A hirudinok véralvadásgátló anyagok, ami a természetben a piócában fordul elő /például az orvosi piócában: Hirudo medicinalis/. A hirudinok egyaránt viselkednek polipeptidekként, melyek hidrofób aminosav-felhalmozódással rendelkeznek az N-terminálison és poláros aminosav-felhalmozódással a C-terminálison, három diszulfid hiddal és véralvadásgátlóként

hatnak. A legtöbb természetes hirudin jellemzője tirozin-szulfát maradék jelenléte a molekula C-terminális részén /Tyr⁶³/. A jólismert HV1, HV2 és HV3 hirudinváltozatokon kívül további hirudinok létezését figyelték meg a természetben, lásd például M. Scharf et al. FEBBS Lett. 255, 105-110 /1989/, ami alátámasztja a hirudinok, mint izoinhibitorcsalád koncepcióját.

A hirudinok, például a hirudin 1. változat /HV1/, a leghatékonyabb és legspecifikusabb ismert trombininhibitor, annak a szerin-proteáznak az inhibitora, amely katalizálja az utolsó lépést /a zimogén fibrinogén alvadóképes fibrinné való átalakulását/ a véralvadásban. A véralvadási folyamat egyéb enzimeit nem gátolják a hirudinok. A heparinnal ellentétben, ami a hagyományos alvadásgátló terápia előnyben részesített szere, a hirudinok gátló hatásukat közvetlenül a trombinon fejtik ki, az előzővel ellentétben, nem hatnak az antitrombin III-on keresztül. A tisztított hirudinok egyetlen, farmakológiailag megfigyelhető hatása a véralvadás gátlása és a trombózis megelőzése. Mellékhatásokat, mint a szivverésre, légzésre, vérnyomásra, trombocitaszámra, fibrinogénre és hemoglobinra gyakorolt hatást még nagy adagok esetén sem figyeltek meg kutyáknak hirudin intravénásan történt beadása után. Állatmodellek sorozatában a hirudinok hatékonynak bizonyultak kísérleti trombózisban /amit pangással vagy trombininjekcióval idéztek elő/, endotoxin sokkban és kiterjedt intravaszkuláris véralvadásban. Valahányszor csak közvetlen összehasonlító vizsgálatokat végeztek, a hirudinok mindig jobbnak bizonyultak a heparinnál.

Az utóbbi években a cDNS-eket és a hirudinváltozatokra kódolt géneket

klónozták és mikróbagazdáknak fejezték ki, mint Escherichia coli és különösen Saccharomyces cerevisiae. Bár a kifejezéssel kapott termékekből Tyr⁶³-nál hiányzik a szulfát monoészter csoport - és ezért nevezték el azokat "deszulfato-hirudinoknak" -, kiderült, hogy lényegében ugyanazt a biológiai aktivitást fejtik ki, mint a természetes szulfáttartalmú hirudinok.

A rekombináns deszulfato-hirudin terápiás alkalmazásának jellemzője a körülbelül 50 perces felezési ideje a vérkeringésben, és ennek következtében gyors kiválasztódása az emberi szervezetből. A gyors kiválasztódás oka az érgomolyok /glomerulusok/ szűrése a vesében olyan anyagok esetén, melyek molekulatömege 70.000 alatt van. E gyors kiválasztódás miatt a deszulfato-hirudin napi adagja normál esetben két vagy több különadagban adandó be. Hosszabban ható trombininhibitorok előállításának egyik lehetősége nagy molekulatömegű hirudinok szintetizálása. WO 91/08229 publikációs számú PCT-bejelentésben polialkilén-glikollal való egyesítése került leírásra. Mivel a polialkilén-glikolok rendes körülmények között molekulaméretüket és -tömegüket tekintve igen sokfélék, hirudinnal való egyesítésük sokféle keveréket hozhat létre, és így egy meghatározott hirudin-adag beadása különböző lehet. Egy másik megközelítésben a hirudin más fehérjével, mint például albuminnal kerül kereszt-kötésbe /WO 92/05748/. Ezek a konjugátumok csökkentett aktivitást és megnövekedett immunogén tulajdonságokat mutatnak, és ezért hosszabb időn keresztül történő szedésre alkalmatlanok.

WO 91/09125 publikációs számú PCT-bejelentésben viszonylag inaktív fúziós fehérjék kerültek leírásra, melyeket az alvadási folyamat enzim-

jeinek kell aktiválniuk, hogy fibrinolitikus vagy alvadékképződést gátló hatásuk legyen.

Meglepő módon most azt fedeztük fel, hogy olyan konjugátumok, melyek 2-4 deszulfato-hirudin muteinből vagy deszulfato-hirudin származékából állnak, jelentősen megnövekedett plazmafelezési idővel rendelkeznek még akkor is, ha a molekulatömeg jóval kisebb, mint a 70.000 körüli kritikus érték, lásd feljebb, meglepő módon nem mutatnak észlelhetően megnövekedett immunogén tulajdonságokat, nem kell a véralvadáshoz szükséges enzimmel hasítani, és aktivitása változatlan. Ezzel a megnövekedett plazmafelezési idővel lehetővé válik a deszulfato-hirudin napi egyszeri bevétele.

Ennek megfelelően jelen találmány tárgyát képezi egy olyan konjugátum, ami lényegében 2-4 deszulfato-hirudin mutein vagy származék maradékából áll, ahol a konjugátum nem fúziós fehérje, és a hirudinhatással rendelkező deszulfato-hirudin muteinek vagy származékok maradékai nem glutáraldehiden vagy karbodiimidin keresztül kapcsolódnak össze.

A "deszulfato-hirudin" kifejezés alatt értendő minden deszulfato-hirudin vegyület, amit irodalomban leírtak, vagy olyan DNS-t tartalmazó, transzformált mikroorganizmus-törzsből nyerhető, mely deszulfato-hirudinra vagy ennek származékára kódol. Ilyen deszulfato-hirudinok például a HV1, HV2 és HV3 /PA/ deszulfato-hirudin származékok, valamint más hirudin- és hirullinfehérjék, ahogyan M. Scharf et al. /FEBS Lett. /1989/, 255, 105-110/ és EP-A-347376 leírja. Ez alatt az értendő, hogy hirudin-származékokat vagy hirudinhatással rendelkező rövidebb fragmenseket

/azaz trombingátló és/vagy trombinkötő hatással rendelkezőket/ is jelent a deszulfato-hirudin megjelölés. Ilyen fragmensek és származékok például a C-terminálison megrövidített deszulfato-hirudinok, azaz olyan deszulfato-hirudinok, melyeknek legfeljebb hét aminosavjuk hiányzik a C-terminálison.

A deszulfato-hirudinok vagy ezek aktiv fragmensei vagy származékai további reakcióképes csoport kapcsolódásával módosíthatók, ahol a reakcióképes csoport trombinaktivitásnak megfelelő biológiai hatást mutat. Például lehetséges a deszulfato-hirudin C-terminálisán elhelyezkedő trombinkötő domén kombinálása kémiai úton szintetizált trombininhibitorral. Példák ilyen kémiaiilag módosított deszulfato-hirudin származékokra a hirulógok /WO 90/04642/.

Egy előnyben részesített kivitelezési formában egy találmány szerinti konjugátum alapvetően deszulfato-hirudin mutein vagy származék két maradákból áll. A találmány szerinti konjugátum összetevői, azaz a deszulfato-hirudin muteinek vagy származékok maradékai, lehetnek azonosak vagy különbözőek.

A deszulfato-hirudin muteinek vagy származékok közvetlenül kapcsolódnak vagy egy összekötő csoporton keresztül. E célból rendes körülmények között deszulfato-hirudin egy vagy több, előnyösen egy tiszta aminosavját egy vagy több gyök helyettesíti, melyek keresztkötésük lehetnek, azaz egy aminosav reaktív oldallánccal rendelkezik.

A találmány tárgyát képezi olyan deszulfato-hirudin mutein vagy száрма-

zék előállítására, amely képes konjugátumokat képezni, főként olyan konjugátumokat, amelyek kettő-négy ilyen deszulfato-hirudin maradékból állnak. A találmány egy előnyben részesített megvalósításában deszulfato-hirudin mutein vagy származék egy vagy több tiszta aminosavját olyan aminosav helyettesíti, amely aszpartámsav, glutaminsav, lizin és cisztein csoportjából került kiválasztásra.

Előnyben részesül egy aminosav helyettesítése, még jobban előnyben részesül egy egyedülálló aminosav ciszteinnel való helyettesítése, és a legjobban előnyben részesül a HV1 deszulfato-hirudinban levő Asp³³ ciszteinnel való helyettesítése.

Két deszulfato-hirudinból álló konjugátum előállítható az egyik maradékban levő aszpartámsav vagy glutaminsav és a másik maradékban levő lizin közötti peptidkötés létrehozásával vagy előnyösen két ciszteinmaradék közötti diszulfid-kötés létrehozásával.

Másik lehetőség szerint, a találmány szerinti konjugátum komponensei /deszulfato-hirudin mutein vagy deszulfato-hirudin származék kettő-négy maradéka/ egy összekötő csoporton keresztül is kapcsolódhatnak. Ekkor a deszulfato-hirudin muteinek vagy származékok reaktív oldalláncon keresztül kapcsolódnak, azaz a fentiekben összekötő molekulaként definiált aminosav reaktív oldalláncán keresztül, mely egy vagy több reaktív csoporttal rendelkezik, előnyben részesül a két reaktív csoport, nevezett reaktív csoportok reakcióképesek, és kovalens kötést tudnak létrehozni a deszulfato-hirudin mutein vagy származék reaktív oldalláncával. Ezek az összekötő molekulát két vagy több reaktív csoporttal rendelkező mo-

lekulák, mint -SH, N_3 , -COOH, -COBr, -COCl, -NH₂, -CHO, -CO-O-CO-,
-CO-NH-CO-. Erre példák N-5-azido-2-nitrobenzoil-oxi-szukcinimid, p-
azido-fenazil-bromid, p-azido-fenil-glioxál, N-4-/azido-fenil-tio/-ftali-
mid, bisz/szulfoszukcinimidil/-szuberát, bisz-maleimidohexán, bisz[2-
/szukcinimido-oxi-karbonil-oxi/-etil]-szulfon, 1,5-difluoro-2,4-dinitro-
benzén, 4,4'-diizotiociano-2,2'-diszulfonsav, sztilbén, dimetil-adipimi-
dát, dimetil-pimelimidát, dimetil-szuberimidát, ditiobisz/szukcinimidil-
propionát/, diszukcinimidil-szuberát, diszukcinimidil-tatrát, dimetil-
3,3'-ditiobiszpropionimidát, 4,4'-ditiobiszfenilazid, 3,3'-ditiobisz-
/szukcinimidil-propionát/, etil-4-azido-fenil-1,4-ditiobutir-imidát,
1-azido-4-fluoro-3-nitrobenzén, N-hidroxi-szukcinimidil-4-azidobenzoát,
metil-4-azido-benzoimidát, m-maleimido-benzoil-N-hidroxi-szulfo-szukcin-
imid-észter, N-hidroxi-szukcinimidil-4-azido-szalicilsav, p-nitrofenil-
2-diazo-3,3,3-trifluoro-propionát, N-szukcinimidil-/4-azidofenil/-1,3'-
ditio-propionát, szulfoszukcinimidil-2-/m-azido-o-nitrobenzamido/-etil-
1,3'-ditiopropionát, N-szukcinimidil-6-/4'-azido-2'-nitrofenil-amino/-
hexanoát, szulfoszukcinimidil-2-/p-azido-szalicil-amido/-etil-1,3'-di-
tiopropionát, N-szukcinimidil-/4-jód-acetil/-aminobenzoát, szukcinimi-
dil-4-/N-maleimidometil/-ciklohexán-1-karboxilát, szukcinimidil-4-/p-
maleimido-fenil/-butirát, N-szukcinimidil-3-/2-piridil-ditio/-propionát,
bisz[2-/szulfoszukcinimidooxi-karbonil-oxi/-etil]-szulfon, diszulfo-
szukcinimidil-tatrát, etilén-glikol-bisz/szulfoszukcinimidil-szukcinát/,
m-maleimido-benzoil-N-hidroxi-szulfoszukcinát, szulfoszukcinimidil-4-
azido-fenil-ditio/-propionát, szulfoszukcinimidil-6-/4'-azido-2'-nitro-
fenil-amino/-hexanoát, szulfoszukcinimidil-4-jód-acetil/-aminobenzoát,
szulfoszukcinimidil-4-/N-maleimidometil/-ciklohexán-1-karboxilát, szul-
foszukcinimidil-4-/p-maleimidofenil/-butirát és 2-iminotiolán.

Az előnyben részesített összekötő molekulák különösen reagálnak az aminosavak -SH csoportjaival, azaz olyan ditio-vegyületekkel, mint ditio-eritrol, ditiotreitol, dimerkap-benzol, 1,4-bután-ditiol, 1,3-propánditiol, rövid aminosav-láncok, melyek két ciszteinnel vagy egyéb -SH keresztkötésű anyaggal rendelkeznek, mint bisz-maleimidohexán, m-maleimidobenzoil-N-hidroxi-szulfoszukcinimid-észter, N-szukcinimidil-/4-jód-acetil/-aminobenzoát, szukcinimidil-4-/N-maleimido-metil/-ciklohexán-1-karboxilát, szukcinimidil-4-/p-maleimido-fenil/-butirát, N-szukcinimidil-3-/2-piridil-ditio/-propionát, m-maleimidobenzoil-N-hidroxi-szulfoszukcinit.

Az aminosavcsere és ebből következően egy másik deszulfato-hirudinhoz vagy összekötőhöz való kapcsolódás olyan területen történik, ami a deszulfato-hirudin hatása szempontjából nem lényeges. A deszulfato-hirudin két funkcionális domént tartalmaz, melyek az α -trombin független részeihez kapcsolódnak; egy kompakt N-terminális magdomén, mely a trombin katalitikus területéhez kapcsolódik /Chang et al., J. Biol. Chem. /1990/, 265, 22159-22166/, és egy rendellenes C-terminális vég, ami kiegészíti az enzim külső részét /fibrinogén felismerő rész/ /Maraganore et al., J. Biol. Chem. /1989/, 264, 8692-8698/. Két monomer összekapcsolása a C-terminális területén keresztül nem kívánatos, mivel majdnem minden aminosav-maradék e doménon belül szükséges a deszulfato-hirudin teljes hatásához /Chang, J. Biol. Chem. /1990/, 265, 22159-22166/. Azonban az N-terminálison belül van egy rugalmas spirál /30-40 maradék, különösen 31-36 maradék/, ami a felületen helyezkedik el, és messze van a trombinkötő résztől /Grütter et al., EMBO /1990/, 9, 2361-2365/. A deszulfato-hirudin monomerek átalakítása és a deszulfato-hirudin monomerek

jelen találmány szerinti konjugátumokká való összekapcsolása előnyös a 7-50 aminosav maradék közötti területen, előnyösebb a 30-40 közötti területen, és különösen előnyös a 31-36 közötti területen. Leginkább előnyben részesül a HV1 deszulfato-hirudin, ahol Asp³³-at cisztein helyettesíti. Ezért a deszulfato-hirudin muteinek vagy származékok monomerjei vagy a deszulfato-hirudin mutein vagy monomer származéka és az összekötő csoport előnyösen a 7-50 aminosav-maradék közötti területen, előnyösebben a 30-40 közötti területen és legelőnyösebben a 31-36 közötti területen kerül összekapcsolásra.

Az aminosav megváltozásának köszönhetően a kialakuló módosult deszulfato-hirudin lánc hajlása eltérő lehet a módosítás nélküli deszulfato-hirudin hajlásától. Ha az eredeti deszulfato-hirudin-szerkezet nem spontán módon alakult, az izolált deszulfato-hirudin megfelelő feltételek mellett denaturálható és újból összehajtható olyan alakzatúvá, hogy trombingátló hatást mutasson.

Számos publikáció jelent meg, melyek baktériumgazdáiban termelődött egyes fehérjék újbóli összehajtási kísérletéről számolnak be, vagy melyek más módon vannak denaturált vagy nem természetes alakban. Dimer, biológiailag aktív humán telep kialakulása, ami ösztönzi az 1. faktort /CSF-1/ E. coli-ban való kifejezés után, került leírásra WO 88/8003-ban és Halenbeck, R. et al. Biotechnologie /1989/, 7, 710-715. oldalon. A leírt folyamatok magukba foglalják a komplexekből redukciós körülmények között izolált CSF-1 monomerek kezdeti oldhatóvá tételének lépéseit kaotróp környezetben, ami karbamidot vagy guanidin-hidrokloridot tartalmaz, aminek újbóli összehajtása a kaotróp anyagok lépésenkénti higitá-

sával végezhető el, és az újból összehajtott molekula redox-rendszerben történő végső oxidációjával WO 88/8849-ben rekombináns interleukin-2 /IL-2/ visszanyerésére irányuló folyamat kerül leírásra, azzal jellemezve, hogy a refraktil testekből izolált IL-2-t redukciós körülmények között 6 M guanidin-hidrokloriddal denaturálják, az oldható IL-2-t Cu^{2+} ionok jelenlétében ellenőrzött oxidációval oxidálják, és az oxidált IL-2-t a denaturálószer koncentrációjának csökkentésével az oldatban újból összehajtják. Interleukin-2-t és interferon- β -t hajtottak újból össze SDS felhasználásával az oldhatóvá tételhez és Cu^{2+} ionok felhasználásával a teljesen redukált protein oxidációgyorsítójaként /US-A-4572798/. A rekombináns refraktil proteinek elválasztási folyamata, a-hogyan US-A-4 620 948-ban leírásra került, erősen denaturáló anyagokat foglal magába, hogy oldhatóvá tegye a proteineket, redukciós körülményeket, hogy megkönnyítse a helyes összehajtást és a denaturáns visszaállítását levegő vagy más oxidáló anyag jelenlétében, hogy átalakítsa a diszulfid-kötéseket. Nem összehajtott proteinek, ami citokróm c, ovalbumin és tripszin inhibitort foglal magába, renaturálási módszere kerül leírásra WO 86/5809-ben, ami a denaturált protein szilárd mátrix-szá reverzibilisen való kötésével és a denaturálószer hígításával való fokozatos renaturálásával történik. Az előzőekben felsorolt hivatkozások csupán annak a hatalmas mennyiségű irodalomnak a képviselői, ami a különböző forrásokból nyert nem természetes proteinek újbóli összehajtásával foglalkozik. Másrészt, aki járatos a témában, tudja, hogy az újbóli összehajtási kísérletek eredménye nem jósolható meg. A sikertelen kísérletekről általában nem számolnak be. Nem biztos, hogy a leirt újbóli összehajtási feltételek valamelyike egyáltalán működne egy megadott denaturált proteinnel, mint deszulfato-hirudin muteinokkal vagy származékokkal.

Figyelembe véve azt a tényt, hogy a módosítatlan deszulfato-hirudin 6 ciszteinmaradékot tartalmaz, és a deszulfato-hirudin HV1, ahol az Asp³³-at cisztein helyettesíti, 7 ciszteinmaradékot tartalmaz lánconként, valamint számos intramolekuláris diszulfid-kötést, melyek a hatékonysághoz szükségesek, rendkívül nehéz feladat biológiailag aktív polimer és különösen dimer deszulfato-hirudint előállítani monomer, denaturált, vagy másképpen nem természetes alakjából.

Ezért a találmány tárgyát képező módszer létrehozása deszulfato-hirudin muteinek vagy származékok szétnyitására és újbóli összehajtására biológiailag aktív polimer és különösen dimer formává, ami a következő lépéseket foglalja magába:

- a fentiekben definiált deszulfato-hirudin denaturálása kaotróp anyaggal,
- a deszulfato-hirudin renaturálása újbóli összehajtási feltételek mellett, és ha szükséges
- a deszulfato-hirudinok összekapcsolása összekötő segítségével vagy közvetlenül.

Kaotróp anyagok azok, melyek megfelelő koncentrációban képesek a proteinek hatékony denaturálására a megfelelő protein térbeli konfigurációjának megváltoztatásával felületük módosításával, vagy a hidratáltsági állapot, az oldószerkörnyezet vagy vizes oldatokban az oldószer-felszín kölcsönhatás változtatásával, ami jól ismert a szakterületen. Példák ilyen kaotróp anyagokra vagy denaturáló szerekre karbamid, guanidin-hidroklorid, nátrium-tiocianát körülbelül 4-9 mól koncentrációtartományban, és detergensnek, mint SDS, amely 0,01-2%-os nagyságrendű koncentrációban

kerül alkalmazásra. Vizes oldatok savanyítása pH = 4 alá vagy lúgos körülmények pH = 10 fölött és a megemelt hőmérséklet a monomer denaturálódását okozza.

Az "Újbóli összehajítás feltételei" kifejezés olyan pufferkörülményekre vonatkozik, ahol a denaturált monomer számára lehetséges lesz a biológiai aktivitást mutató konformáció felvétele. A hagyományos pufferrendszerek, mint a Tris-, foszfát-, karbonát- vagy citrát-pufferek, körülbelül pH = 6-10-ig terjedő tartományban használhatók. Az újbóli összehajítás feltételei elősegítik a diszulfid-kötés kialakulását. Ezek a feltételek magukba foglalják például oldódást elősegítő szer és redox rendszer jelenlétét, amely lehetővé teszi a tiol-/diszulfid-párok folyamatos oxidációját és redukcióját. A pufferrendszer ezen kívül tartalmazhat megfelelő sókat.

Megfelelő, oldódást elősegítő szerek detergenssek, előnyösen enyhe detergenssek, szerves, vízzel elegyedő oldószerek, vagy foszfolipidek vagy ezek keverékei.

Megfelelő redox rendszerek azok, melyek elősegítik diszulfidok kialakulását, például kis molekulatömegű szulfhidriát/diszulfid-reagenskombinációk, mint a glutation oxidált és redukált formájában, ditiotreitol oxidált és redukált formájában, β -merkaptó-etanol vagy β -merkaptó-metanol oxidált vagy redukált formájában, cisztein és redukált formája, ciszta-min és redukált formája körülbelül 1-100 mM koncentrációban, különösen körülbelül 1-10 mM koncentrációban. Tiorodoxin vagy diszulfid-izomerázok körülbelül 10-1000 $\mu\text{g/ml}$ koncentrációnál, különösen 50-200 $\mu\text{g/ml}$

koncentrációnál alkalmazhatók a kis molekulatömegű szulfhidril-/diszulfid-rendszer helyett.

Adott esetben, az intermolekuláris és intramolekuláris diszulfid-képzés további elősegítésére Cu^{2+} -ionokat /mint CuCl_2 , $\text{Cu}/\text{NO}_3/2$ vagy o-fenantrolin/ Cu^{2+} komplexek/ vagy Fe^{3+} -ionokat /mint FeCl_3 vagy $\text{Fe}_2/\text{SO}_4/3/$ tartalmazó, oxidációt elősegítő szer adható az újbóli összehajtogatáshoz használt pufferhez. Hatékony mennyiség az a mennyiség, amely minimálisan szükséges a szulfhidril-csoportok oxidációjához megfelelő időtartamon belül, és amely közel ekvivalens a szabad szulfhidril-csoportok koncentrációjával a kívánt diszulfid-kötések képzésében résztvevő deszulfato-hirudin muteinekben vagy származékokban. Az előnyös mennyiségek tartománya 0,001-100 μM .

Továbbá O_2 vagy levegő buborékoltható át az újbóli összehajtáshoz használt pufferen oxidációt elősegítő szerek jelenlétében vagy távollétében. Az oxidáció kivitelezhető elemi jód vagy benzokinon-származékok alkalmazásával is.

A deszulfato-hirudin 1. variáns esetén, ahol például az Asp^{33} -at ciszteinnal helyettesíti $[\text{Cys}^{33}/\text{HV1}]$, a denaturációs, hajtogatási és dimerizációs lépéseket általában a deszulfato-hirudin önmagában ismert módon történő izolálása után végezzük annak érdekében, hogy homogén terméket kapjunk. A kiindulásként izolált deszulfato-hirudin például denaturálva van guanidin-hidroklorid redukciós körülmények között történő adagolásával, újra van hajtogatva a guanidin-hidroklorid eltávolításával lúgos körülmények között, és ezt követően a $[\text{Cys}^{33}]\text{HV1}$ monomerek oxidálása és

egyidejű dimerizálása történik $[\text{Cys}^{33}]_{\text{HV1}} - [\text{Cys}^{33}]_{\text{HV1}}$ dimerré.

A Cys^{33} monomer és a dimer egyaránt nagy aktivitású antikoaguláns, és trombininhibíciós potenciáljuk alig megkülönböztethető $\pm 3\%$. Ez azt sugallja, hogy egy diszulfato-hirudin dimer két α -trombin molekulához kötődik.

Szintetikus összekötő molekula esetében az újból összehajtott deszulfato-hirudin muteinek vagy származékok önmagában ismert módon kapcsolhatók az összekötő molekulához. A reaktív aminosavak, melyeknek nem kell az összekötő molekulához kapcsolódniuk, védhetők a szokásos védőcsoportokkal, amelyek például leírásra kerültek a következő könyvekben: "Protective Groups in Organic Chemistry", Plenum Press, London, New York 1973, "Methoden der organischen Chemie", Houben-Weyl, 4th Edition, Vol. 15/1, Georg-Thieme-Verlag, Stuttgart 1974 és Th. W. Greene, "Protective Groups in Organic Synthesis", John Wiley and Sons, New York 1981. A védőcsoportokra jellemző, hogy könnyen eltávolíthatók anélkül, hogy másodlagos reakciók történnének például szolvólízis, redukció vagy fotolízis által.

A változtatások a deszulfato-hirudin mutein vagy származékok aminosav sorrendjében történhetnek helyben irányított mutagenézissel, ha genetikailag kódolt aminosavak beépítése szükséges. Más különben legalább a deszulfato-hirudin mutein vagy származékok változtatást hordozó részét kémiailag kell szintetizálni, például az első genetikailag szintetizált deszulfato-hirudin mutein vagy származék rész szilárd fázishoz kapcsolásával és a hiányzó gyökök a rögzített polipeptidhez való, önmagában ismert módon történő hozzáadásával.

Az egyszerűség kedvéért a deszulfato-hirudin módosítása, azaz egy aminosav megváltoztatása nem proteinszinten történik. Ehelyett előnyös a deszulfato-hirudint kódoló gén módosítása helyben irányított mutagenézissel olyan módon, hogy a módosított gén gazdaszervezetben törgénő kifejeződésekor a kívánt deszulfato-hirudin mutein képződik, melyben egy vagy több aminosav helyettesítve van olyan aminosavakkal, melyek kötést tudnak képezni egy további deszulfato-hirudinnal vagy egy kapcsolódó molekulával. Egy előnyös megvalósítási mód egy aminosav helyettesítése ciszteinnel.

A deszulfato-hirudin mutein találmány szerinti előállítás módja a megfelelő táplálási feltételek között transzformált gazdasejtek tenyésztése, melyek olyan DNS-szekvenciát tartalmaznak, ami azt a hirudin muteint kódolja, melyben egy vagy több aminosav olyan aminosavval van helyettesítve, ami képes kötést képezni egy további deszulfato-hirudin muteinnek vagy egy kapcsoló molekulának, valamint ennek a deszulfato-hirudin muteinnek az izolálása.

Megfelelő gazdasejtek például baktériumok, például az E. coli, vagy eukarióta gazdasejtek, például az élesztő, mint a Saccharomyces cerevisiae. A jelen találmány esetében az előnyös gazdaszervezet a Saccharomyces cerevisiae.

A gazdasejtek, különösen az élesztő, mely a fenti DNS-szekvenciát tartalmazza, önmagában ismert módon tenyésztethető.

A DNS-ek, beleértve a SEQ ID NO:5 és 7-ben bemutatottakat, a technika

állásából ismert módon gyárthatók. E DNS-ek gyártási módszerei magukba foglalják a DNS kémiai szintetizálását, a nem kívánt aminosav maradéknak megfelelő módon való kimetszését a DNS ezt tartalmazó részéből az eredeti hirudin génből és a kimetszett rész helyettesítését egy DNS szegmenssel, ahol a szóbanforgó kódon szubsztituálva van egy dezoxiribonukleotid triplettel, mely a kívánt aminosav maradékot kódolja vagy "site directed" mutagenezissel végzett dezoxiribonukleotid szubsztitúciót.

A DNS kémiai szintézise jól ismert a technika állásából, és szokásos módszerek használatát igényli. A megfelelő módszereket S. A. Narang gyűjtötte össze /Tetrahedron /1983/,39, 3/. A módszerek részletesen a 146785 publikációs számú európai szabadalmi bejelentésben kerültek leírásra.

Az érett hirudin DNS egy részének kihasítását restrikciós enzimekkel lehet megvalósítani. Ennek a módszernek előfeltétele megfelelő restrikciós helyek hozzáférhetősége a változtatni kívánt kódon szomszédságában. Endonukleáz-hasítással egy kis restrikciós fragmens - mely nem kívánt aminosav kodonjait tartalmazza - eltávolítható. A megfelelő kétszálú DNS szekvencia előállítható például kémiai szintézissel, melyben a kívánt aminosavat kódoló tripleteket használják. A DNS fragmenst megfelelően elhelyezve a maradék nagy fragmenshez kapcsolják, hogy a desulfato hirudin muteint kódoló kétszálú DNS szekvencia keletkezzék. A kényelem kedvéért, és hogy a hirudin gén kezelését meg lehessen könnyíteni, az utóbbi előnyösen egy nagyobb, megfelelő kapcsoló molekulákkal ellátott DNS szegmensbe van belefoglalva, mely lehetővé teszi a szeg-

mens beillesztését és klónozását egy klónozó vektorba.

A jelen találmány előnyös megvalósítási módja a SEQ ID NO:7 DNS-szekvenciákat tartalmazó DNS-ek előállítása "site-directed" mutagenézis útján. Ez a módszer egy in vitro mutagenézis eljárás, amellyel a klónozott DNS egy régiójában egy meghatározott hely változtatható /vö. M. J. Zoller and M. Smith, Methods Enzymol/1983/, 100, 468; D. Botstein and D. Shortle Science, /1985/, 229, 1193 beszámoló cikkekkel/.

A vad típusú hirudin gén mutációs módszerére jellemző, hogy az egyszálú, vad típusú hirudin gént vagy az egyszálú, vad típusú hirudin gént tartalmazó DNS-t hibridizálják egy primer oligodezoxiribonukleotiddá, amely a mutálandó hirudin gén területének komplementerje, kivéve azt az egy vagy több hibát, amely az egy vagy több mutációt irányítja, a hibridizált oligodezoxiribonukleotidot primerként alkalmazzák a kiegészítő DNS-szál szintézisének indításához, a kapott részben kétszálú DNS-t átviszik egy befogadó mikroorganizmus törzsbe, például PCR-en keresztül, a mikroorganizmus törzset szaporítják, és a DNS-t tartalmazó transzformátorokat, melyek módosított hirudin gént tartalmaznak, kiválasztják.

Egy előnyös megvalósítás esetében az /1/ és /4/ oligodezoxinukleotid primereket, mint lenti és fenti komplementereket használják a templát DNS-t kiegészítő kívánt szekvenciánál, a két felső, /2/ és /3/ primert azért használják, mivel részben egymás komplementerei, és mindkettő fedi a mutáció helyét. A PCR /1/ és /3/ primereket és a /2/ és /4/ primereket párosával használják a DNS templát részeinek kiegészítésére és a mutáció bevezetésére. Egy második reakcióban mindkét terméket összeke-

verik, és kiegészítik az /1/ és /4/ primerekkel.

A vad típusú hirudin gént előnyösen plazmidban helyezik el, például az EP-A-143 081 vagy EP-A-340 170 publikációs számú szabadalmi bejelentésben leírt valamely plazmidban. A mutagenézishoz a hirudin gént előnyösen izolálják a plazmidból, például restrikciós endonukleázzal történő feltárással, mely kétszálú DNS-t eredményez, mely a hirudin gént tartalmazza, adott esetben más funkciókkal összekapcsolva, például promotor, jelző peptid DNS stb. ragadós végeket hordozva, valamint kiegészítve PCR-en keresztül vagy ligálva egy megfelelő restrikciós fragmenssel, ami egy replikatív formához vagy egy egyszálú DNS fágához tartozik, mint egy M13 fág származékához, például M13mp8 vagy M13mp9. Alkalmas mikroorganizmusokat, például kalciummal kezelt E. coli sejteket kezelnek a hibrid fág vektorral, és a beillesztett hirudin gént tartalmazó, egyszálú fág DNS-t izolálják a szaporított sejtek felülúszójából. Ehhez a templáthoz a hibás /mutált/ oligodezoxiribonukleotid primer hibridizálódik.

Néhány, az irodalomban leírt módszer függ a mutált primer enzimikus kiterjesztésétől a kör alakú templát mentén, melyet ligáció követ, mely kovalensen zárt, kétszálú molekulát eredményez, ahol a mutáció/k/ az újonnan szintetizált szálban vannak. Ezen eljárás általában alacsony hatékonyságú, ezért módosított eljárást fejlesztettek ki /K. Norris et al., Nucl. Acids Res. /1983/, 11, 5103/, amelyben egy második primert alkalmaznak. M13 fág vektor esetében előnyösen egy általános M13 szekvenciát előállító primert használnak /EP-A-225- 286/.

Deszulfatohirudint kódoló DNS szekvenciákat tartalmazó hibrid vektorok

A találmány olyan hibridvektorokra is vonatkozik melyek egy promotort

és egy olyan humán deszulfato-hirudin muteint kódoló DNS szekvenciát tartalmaznak, melyben egy vagy több aminosav olyan aminosavakra van cserélve, melyek képesek kötést képezni egy további deszulfato-hirudinnal vagy egy kapcsoló elemmel, a DNS szekvencia nevezett promotor transzkripció irányítása alatt áll.

A találmány szerinti hibrid vektorokat a hibrid plazmidból és egy lineáris DNS vektorból álló csoportból választják ki, és a további szelekció a transzformációban felhasznált gazdaszervezettől függően történik.

Promotorok az élesztő számára - melyek a legelőnyösebb gazdaszervezetek jelen találmány esetében - élesztő eredetű genom DNS-ből származtatottak, különösen Saccharomyces cerevisiae - eredetűek. Előnyösen erősen kifejezett élesztő gént használnak deszulfato-hirudin mutánsok kifejezésére. Így a TRP1 gén, az ADHI vagy ADHII gén, az acid foszfatáz /PHO5/ gén, CUP1 gén, izocitokróm c gén, vagy a glikolitikus enzimeket kódoló gének promotorjai, mint például a TDH3, gliceraldehid-3-foszfát dehidrogenáz /GAPDH/, vagy előnyös a GAPDH rövidített verziója /GAPFL/, vagy a 3-foszfoglicerát kináz /PGK/, hexokináz, piruvát dekarboxiláz, foszfofruktokináz, glukóz-6-foszfát isomeráz, 3-foszfoglicerát mutáz, piruvát kináz, trioszfoszfát izomeráz, foszfoglukóz izomeráz, invertáz és glukukináz gének, vagy egy promotorja az élesztőszaporító feromon gén a vagy α -faktort kódoló génje alkalmazható. A jelen találmány szerinti előnyös vektorok transzkripció szabályozású promotorokat tartalmaznak. Az ilyen típusú promotorok, azaz a PHO5 vagy CUP1 gének ki-be kapcsolhatók a növekedési feltételek változtatásával. Például a PHO5 promotor be- és kikapcsolható akarunk szerint, csupán a tápközegben az inorga-

nikus foszfát koncentrációjának növelésével vagy csökkentésével. Így a promotor kikapcsolható az élesztő exponenciális növekedési fázisában, és bekapcsolható csupán a korai stacionárius fázisban a maximális sejtsűrűségnél, mely lehetővé teszi a gén kifejeződését, melyet a PH05 promoter irányít. A CUP1 promoter bekapcsolható Cu^{2+} ion tápközeghez adásával például réz-só formájában.

A jelen találmány szerinti hibrid vektorokban a promoter működőképesen kapcsolódik a mutáns hirudint kódoló régióhoz, így biztosítva a desulfato-hirudin mutein hatékony kifejeződését. A jelen találmány előnyös megvalósítási módja szerint, különösen, ha élesztőhasználnak gazdaszervezetként, egy jelző szekvencia a konstrukcióba bele van foglalva. Megfelelő jelző szekvenciák kiválasztott élesztő gén termékek, például a PH05, invertáz vagy α -faktor jelző szekvenciák vagy a hirudin jelző szekvencia. Más esetben egyesített jelző szekvenciákat is lehet létrehozni az élesztő promoterhez természetesen kapcsolódó gén jelző szekvenciájából és a hirudin jelző szekvencia egy részéből összekapcsolva. Azok a kombinációk előnyösek, amelyek lehetővé teszik a precíz hasítást a jelző peptid és az érett, kialakult hirudin aminosavszekvencia között. Járulékos szekvenciák, mint proszekvenciák vagy spacer szekvenciák, amelyek hordozhatnak vagy nem hordozhatnak specifikus eljárásjeleket, szintén benne lehetnek a szerkezetekben, hogy elősegítsék a prekursor molekulák pontos termelődését. Továbbá egyesített fehérjék képezhetők, melyek olyan belső eljárásjeleket tartalmaznak, amik az in vivo vagy in vitro fehérjeképződést szabályszerűen teszik lehetővé. Előnyösen az eljárás jelek Lys-Arg maradékot tartalmaznak, amelyeket a Golgi-membránokban elhelyezkedő élesztő endopeptidázok felismernek.

A mutáns hirudin gén kifejeződésekor a termék a kiválasztási csatornába kerül, és a periplasmikus térbe transportálódnak. Ha további kiválasztódást sikerül elérni a sejtfalon keresztül a tápközegbe, akkor jelentős hozamnövekedés lehetséges. A kinyerés is egyszerűsödhet sejtfeltárás nélkül.

Előnyösen, a jelen találmány szerinti hibrid vektorok egy olyan gén 3'-oldal szekvenciáját is tartalmazzák, melyek a transzkripció leállítását illetve a poliadenilációt előidéző megfelelő jeleket tartalmazza. A megfelelő 3'-oldalszekvenciák például azok, amelyek az alkalmazott promotorhoz természetesen kapcsolt gének vagy más élesztő gének 3'-oldalfrekvenciái, például a PHO5 gén.

A találmány szerinti előnyös hibrid plazmidokban a járulékos DNS szekvenciák egy élesztő replikációs origót és egy szelektív élesztő genetikai markert hordoznak az élesztő replikációs origót, azaz autonóm módon replikálódó szegmenset /Ars/ tartalmazó hibrid plazmidok extra kromoszómáisan maradnak az élesztősejten belül a transzformáció után, és önállóan replikálódnak a mitózishoz. Az élesztő 2 μ plazmid DNS-sel homológ szekvenciákat tartalmazó hibrid plazmidok szintén használhatók. Ezek a hibrid plazmidok a 2 μ plazmidokba rekombinációval integrálódnak, melyek már a sejtben jelen vannak, vagy önállóan replikálódnak. A 2 μ szekvenciák különösen alkalmasak nagyfrekvenciájú transzformációs plazmidoknak, és nagy másolati számokat biztosítanak.

Továbbá a jelen találmány szerinti előnyös hibrid plazmidok magukba foglalhatnak egy DNS szekvenciát egy gén részeként, mely a gazdaélesztő

kromoszómában van jelen /például a PH05 gén vagy promotorja, mely a mután hirudint kódoló régióhoz van kapcsolva/. A homológ szekvencia folytán, amelynek körülbelül 20-100 dezoxinukleotid hosszúságúnak kell lennie, az egész plazmid vagy lineáris szegmense stabilan be tud épülni a gazda kromoszómába rekombináció útján. Így szaporítás során az utódsejtek megőrzik a bevitt genetikai anyagot még szelekciós nyomás nélkül is.

•

Ami az élesztő szelektív génmarkert illeti, bármely olyan gén használható, ami elősegíti a marker fenotipusos kifejeződésének megfelelő transzformánsok szelekcióját. A megfelelő élesztőmarkerek különösen azok, melyek antibiotikum rezisztenciát fejeznek ki vagy az auxotróf élesztőmutánsok esetében a gének, melyek a gazdakárosodásokat pótolják. A megfelelő gének biztosítják például az antibiotikus cikloheximiddel szembeni ellenállóképességet, vagy a prototrófiát biztosítják egy auxotróf élesztőmutánsban, például az URA3, LEU2, HIS3 vagy TRP1 gén. Lehetséges markerként struktúrális gének alkalmazása is, amelyek kapcsolódnak egy autonóm módon replikálódó szegmenshez, biztosítva, hogy a transzformálódó gazda auxotróf a marker által kifejezett termékkel szemben.

Előnyösen a járulékos DNS szekvenciák, melyek jelen vannak a találmány szerinti hibrid plazmidokban, szintén tartalmazhatnak egy replikációs origót és egy szelektív genetikai markert egy bakteriális gazdaszervezethez, különösen Escherichia coli-hoz. Léteznek hasznos jellemzők, melyek egy E. coli replikációs origó és egy E. coli marker jelenlétéhez kapcsolódnak egy élesztő hibrid plazmidban. Először nagy mennyiségű hibrid plazmid DNS kapható E. coli-ban szaporítással és erősítéssel, és másodszor hibrid plazmidok konstrukciója megfelelően elvégezhető E. coli-

ban az E. coli-n alapuló klónozási technológia teljes eszköztárával. Az E. coli plazmidok, mint a pBR322 és hasonló, E. coli replikációs origót és egy antibiotikumokkal, például tetraciklinnel és ampicillinnel szembeni rezisztenciát biztosító megfelelő genetikai markert tartalmazhatnak, és előnyösen alkalmazható, mint az élesztő hibridvektorok része.

A járulékos DNS szekvenciákat, amelyek például élesztők és bakteriális gazdaszervezet részére replikációs origót és genetikai markereket tartalmaznak, ezután "vektor DNS"-nek nevezzük, amely az élesztő promotorral és a mutáns hirudint kódoló régióval együtt alkotják a találmány szerinti hibrid plazmidot.

A jelen találmány szerinti előnyös hibrid vektorok a technika állásából ismert módszerekkel, például az élesztő promotor egy mutáns hirudint kódoló régió, egy élesztő gén 3'-oldalszekvencia és adott esetben egy vektor DNS összekapcsolásával.

Hibrid plazmidok előállítására kényelmesen feltérképezett gyűrű alakú DNS, például bakteriális plazmid DNS vagy hasonló alkalmazható, ha legalább egy restrikciós területtel, előnyösen 2 vagy több restrikciós hellyel rendelkeznek. Előnyösen a vektor DNS már tartalmazza a replikációs origókat és génmarkereket az élesztők és/vagy egy bakteriális gazdaszervezet részére. A vektor DNS hasítása megfelelő restrikciós endonukleázzal történik. A leszűkített DNS-t egy élesztő promotort tartalmazó DNS fragmenshez és egy deszulfáto-hirudin muteint kódoló DNS részlethez kapcsolják. A promotor és a mutáns hirudint kódoló régió kapcsolása előtt vagy után /vagy ezzel egyidejűleg/ lehetséges a replikációs

origó és/vagy markerek az élesztőbe vagy egy bakteriális gazdaszervezetbe való bevitele. Mindenesetre a restrikció és a kapcsolás körülményeit olyan módon kell megválasztani, hogy ne legyen interferencia a vektor DNS és a promotor lényegi funkcióival. A hibridvektort vagy szekvenciálisan vagy 2 olyan DNS szegmens összekapcsolásával lehet felépíteni, ahol az összes szóbanforgó szekvenciát tartalmazza a két DNS.

Különböző technikák alkalmazhatók in vitro a DNS szegmensek összekapcsolására. Letompított végek /teljesen bázispárban álló DNS kettős spirálok/, bizonyos restrikciós endonukleázokkal előállítva, közvetlenül összekapcsolhatók T4 DNS ligázzal. Gyakrabban a DNS szegmensek egyszálú tapadó végeiben keresztül kapcsolódnak, és kovalensen zártak egy DNS ligáz, például T4 DNS ligáz útján. Ilyen egyszálú "tapadós végű" DNS más endonukleáz csoporttal való hasításával állítható elő, ami lépcsősen elhelyezkedő végeket eredményez /a DNS kettős spirál két szála különböző helyeken van elhasítva néhány nukleotidnyi távolságra/. Egyedülálló szálak előállíthatók nukleotidoknak a legömbölyített véghez vagy a szabad végekhez való hozzáadásával terminál transzferáz alkalmazásával /"homopolymeric tailing"/ vagy egyszerűen a legömbölyített DNS szekvencia egyik szálának visszabontásával megfelelő exonukleáz - olyan, mint a λ exonukleáza - alkalmazásával. Egy további megközelítés szabad végek előállítására tartalmazza a legömbölyített végű DNS-hez egy kémiai úton szintetizált kapcsolódó DNS összekapcsolását - amely tartalmaz egy felismerőhelyet egy szabad vég formáló endonukleázhoz- és a kapott DNS emésztését a megfelelő endonukleázzal.

A találmány szerinti hibrid vektor alkatrészei; élesztő promotor, a mu-

táns hirudin strukturális génjei - adott esetben a szignál szekvenciát is belefoglalva - a transzkripció leállítót, a replikációs rendszert stb. beleértve, előre meghatározott sorrendben vannak összekapcsolva, hogy a megfelelő funkciókat biztosítsák. Azok a komponensek, melyek közös restriktációs helyeken át vagy szintetikus kapcsoló molekulákkal vannak összekapcsolva, hogy a komponensek helyes sorrendjét és a komponensek helyes orientációját biztosítsák.

Egy lineáris DNS vektor az ismert módszerekkel előállítható, azaz a fenti élesztő promotor mutáns hirudint kódoló régió és a keletkező DNS olyan DNS szegmenssel van ellátva, mely élesztőgénekből származó transzkripciót leállító jelzésekkel van ellátva.

DNS szegmensek kapcsolása a fent részletezett módon végezhető tompa vég ligációval, tapadós végeken keresztül vagy kémiai szintetizált kapcsoló DNS-ek útján.

Közelebbről, a hatékony kifejezés érdekében, a mutáns hirudin génnek megfelelően kell elhelyezkednie a transzkripció /élesztő promotor/ és transzlációs funkciókat tartalmazó/riboszóma kötő helyek/szekvenciákhoz képest. Először a promotort mutáns hirudint kódoló régióval tartalmazó DNS szegmens ligációjának meg kell valósulnia helyes orientációban. Ha két orientáció lehetséges, a helyest konvencionális restriktációs analízissel meg lehet határozni. A hibrid vektorok, melyek helytelenül orientálódott mutáns hirudin gén inzerteket tartalmaznak, újra elrendezik a gén inzert megfelelő restriktációs endonukleázzal történő kivágásával és a gén és a hibrid vektor fragmens újraösszekapcsolásával. Bizonyos ese-

tekben a helytelen orientációt két olyan DNS szegmens összekapcsolásával kerül el, ahol mindegyik végen eltérő restrikciós helyek vannak. Továbbá a hibrid vektor konstruálását oly módon kell végezni, ami lehetővé teszi a helyes transzkripció kezdést és befejezést. Ami az utóbbit illeti, az átírásnak előnyösen be kell fejeződnie az élesztő kromoszómális DNS-ből vagy élesztő 2μ plazmidből származó DNS szekvenciában. Továbbá egy megfelelő olvasó vázat kell létrehozni. Rendszerint a promotor régió és a mutáns hirudint kódoló régió nukleotid sorrendje ismeretes a kapcsolás előtt vagy könnyen meghatározható úgy, hogy nincsenek problémák a helyes olvasókeret létrehozásakor.

Ha az érett deszulfato-hirudin mutein kifejezése citoplazmában való felhalmozódása a cél, a szignál szekvenciák vagy részeit adott esetben a promotor régiót követő és/vagy adott esetben az érett mutáns hirudinkódoló régiót megelőző részeit el kell távolítani például egy exonukleázsal, például Bal31, történő digesztálással. Egy előnyös régió az élesztő promotor mutáns hirudin kódoló szekvenciához való kapcsoláshoz a nagy mRNS indító helye és az élesztő promotorhoz természetesen kapcsolódó gén ATG része között van. Ebben a régióban a kapcsolódáshoz a mutáns hirudint kódoló szekvenciának rendelkeznie kell saját ATG-vel a transzláció megkezdéséhez vagy biztosítani kell egy járulékos szintetikus nukleotidot. Az élesztő promotor szintén kapcsolódhat egy mutáns hirudin kódoló szekvenciához egy szintetikus oligodeoxiribonukleotid, mint kapcsoló molekula útján. Így a promotor régió esetleg, ha lehetséges, korlátozott közel 3'-terminusára, így hiányzik a bázispárok előre meghatározott száma. Analóg módon a mutáns hirudin kódoló szekvencia korlátozva lehet közel az 5'-terminusra. Egy szintetikus oligodeoxinuk-

leotid olyan módon konstruálható, hogy amikor az élesztő promotor és a mutáns hirudin kódoló szekvencia kapcsolódik egy kapcsoló oligodeoxi-nukleotidon keresztül, a hiányzó bázispárokat újjáépítik, beleértve egy ATG transzlációt indító jelet és a mutáns hirudin kódoló szekvencia egy megfelelő olvasó váz az ATG iniciáló kodonra vonatkozóan.

Ha csak egy deszulfato-hirudin fragmenst használnak, a termelés függ a fragmens hosszától. Általában heterológ proteinek kevesebb, mint 20 aminosavtartalommal nem fejezhetők ki, és izolálhatók megfelelő mennyiségben természetes gazdaszervezetekből, mint amilyen az E. coli és az S. cerevisiae. Egy lehetséges módszer kis proteinek, mint a deszulfato-hirudin karboxi-terminális fragmensének kifejezésére a kérdéses protein beolvasztása egy másik protein vázába és így egy fúziós protein képzése. Számos módszert fejlesztettek ki egy kívánt protein felszabeditására fúziós partneréből /Nishikawa et al., Protein Engineering 1, 487-492 /1987/; Gardella et al., J. Biol. Chem. 265, 15854-15859, /1990/; Altman et al., Protein Engineering 4, 593-600 /1991//. Lehetséges gazdaszervezetek a gombák, mint az élesztők, előnyösen az S. cerevisiae vagy a baktériumok, mint az E. coli.

Megfelelő endogén fúziós partnerek a nagymértékben kifejezett proteinek. Előnyben részesítettek a proteinek, mint az eglin, β -galaktosidáz, β -laktamáz, számos, a triptofánszintézisben résztvevő fehérje az E. coli-ban, protein A vagy kloramfenikol acetil-transzferáz. Az S. cerevisiae-ban előnyösen a kiméra ubiquitin fúziós proteineket alkalmazzák /Sabin et al. Biotechnology 7, 705-709 /1989//.

A kívánt deszulfato-hirudin karboxiterminális fragmensét el kell távolítani a fúziós partner mellől a fúziós protein kifejezése és tisztítása után. Ha nincs természetes hasítási hely a kívánt fragmens és a fúziós partner között, akkor ezt általában egy kapcsoló szekvenciával végzik, amely a kívánt fragmenst a fúziós partnerhez kapcsolja, és tartalmaz egy hasítási helyet, ahol szelektíven kémiai úton vagy enzimatikusan lehet hasítani. Ilyen hasítási helyek magukba foglalják például a metionál csoportot, amely érzékeny a brómcian támadására, egy polipeptid lánc, mely egy tetrapeptid csoportot /Asp-Asp-Asp-Lys/ tartalmaz, ami hasítható a Lys után enterokinázzal vagy bármely más specifikus enzim hasításra érzékeny hely, melyet olyan enzimekkel, mint V8 proteáz, tripszin, peptidáz yscA vagy yscF.

Másik lehetőség rövid fragmens előállítására a peptidszintetizátorral végzett szintézis.

Ha a deszulfato-hirudin muteint vagy származékát élesztőtörzzsel termelik expressziós kazetta, beleértve egy szignálszekvenciát, alkalmazásával, akkor a termelődő deszulfato-hirudin túlnyomó többsége /több, mint 90%/ a tápközegbe kerül kiválasztásra. A deszulfato-hirudint a tápközegből szokásos módszerekkel nyerhetjük ki. Például az első lépés rendszerint a sejtek és a tápközeg folyadék szétválasztása centrifugálással. A kapott felülúszó feldúsítható deszulfato-hirudinra polietilénminnel való kezeléssel a nem fehérjeszerű anyagok legnagyobb részének eltávolításával és a fehérjék kicsapásával, az oldat ammónium-szulfátos telítésével. A gazdaszervezet fehérjéi szintén kicsaphatók ecetsavas savanyítással /például 0,1%, pH = 4-5/. A deszulfato-hirudin további

dúsítása elérhető az ecetsavas felülúszó n-butanolos extrakciójával. Más tisztítási lépések lehetnek például a sótlanítás, kromatográfiás eljárással, mint az ioncserés kromatográfia, gélszűréses kromatográfia, megoszlásos kromatográfia, HPLC, reverz fázisú HPLC /HPLC = nagynyomású folyadékkromatográfia/ és hasonló. A kverék alkotórészeinek elválasztása szintén megvalósítható dialízissel töltés szerint gélelektroforézissel vagy hordozómentes elektroforézissel a molekulaméret szerint megfelelő Sephadex oszloppal, affinitás kromatográfiával, például antitestekkel, különösen monoklonális antitestekkel vagy affinitás kromatográfiához megfelelő hordozóhoz kötött trombinnal vagy más eljárásokkal, különösen az irodalomból ismertekkel. Általában csak néhány tisztítási lépés szükséges, hogy lényegében szennyezőktől mentes deszulfato-hirudint kapjunk.

An anti-deszulfato-hirudinnal vagy az anti-deszulfato-hirudin antitestekkel végzett teszt /például monoklonális antitestekkel/ a trombin teszt /M.U. Bergmeyer /ed./, Methods in Enzymatic Analysis 1983, Vol. II, p. 314-316, Verlag Chemie, Weinheim /FRG//, vagy a véralvadás teszt /F. Markwardt et al., Thromb. Haemost. /1982/, 47, 226/ használható a deszulfato-hirudin aktivitás észlelésére az izolálási és tisztítási lépések során. Szintén lehetséges a kromatográfiás módszerek alkalmazása, mint a HPLC.

Ezért a találmány egyik tárgya a deszulfato-hirudin előállításához egy expressziós kazetta, amely egy promoterből áll, ami működőképesen kapcsolva van egy első DNS szekvenciához, ami kódol egy jelzőpeptidet, ami

kapcsolva van egy megfelelő olvasó vázhoz egy másik DNS szekvenciához, ami kódolja a nevezett deszulfato-hirudint illetve -származékokat és egy DNS szekvenciát az átirásbefejező jelekkel.

A találmány további tárgya egy eljárás biztosítása olyan deszulfato-hirudin konjugátumok előállítására, amik lényegében kettő-négy deszulfato-hirudinból vagy származékából állnak, amely eljárás áll

- a megfelelő deszulfato-hirudin monomer előállításából, például a megfelelő deszulfato-hirudin kifejezésével megfelelő gazdaszervezetben,
- a deszulfato-hirudin izolálásából,
- a reaktív aminosav oldallácok védelméből, ha szükséges,
- a deszulfato-hirudin monomer kapcsolásából egy megfelelő kapcsolóval vagy direkt kapcsolással, pl. diszulfid kötéson keresztül két deszulfato-hirudin monomer között.

Gyógyszerkompozíciók

A jelen találmány szerint kapható új deszulfato-hirudin konjugátumok értékes farmakológiai tulajdonságokkal rendelkeznek, és a piócákból extra-hált monomer deszulfato-hirudinhoz hasonlóan profilaktikusan vagy kiegészítőként terápian használhatók.

A találmány szerinti deszulfato-hirudin konjugátumok a természetes hirudinhoz hasonlóan a trombin erőteljes inhibitorai. Például K_i értékük 10^{-9} M és 10^{-13} M között van. A deszulfato-hirudin konjugátumok teljesen trombinspecifikusak, és nem mutatnak kölcsönhatást a véráramrendszerrel.

más proteínázaival. A toxicitás rendkívül alacsony. Hasonlóképpen túlérzékenységi reakciókat vagy allergiás reakciókat nem figyeltek meg. A deszulfato-hirudin konjugátumok magasabb szérumbeli felezési ideje miatt a deszulfato-hirudin napi dózisa egyetlen adagban beadható.

Ezért a találmány szerinti új deszulfato-hirudin konjugátumok a természetes hirudinnal analóg módon használhatók a trombózisok és tromboembóliák terápiájában és profilaxisában, beleértve a posztoperatív trombózisok profilaxisát /például szeptikus vagy politraumás sokknál/ a fogyasztási koagulopátiákat, a hemodializist, vérszeparálást és az extrakorporális vérkeringés megvalósítását.

A találmány gyógyszerkészítményekre is vonatkozik, melyek terápiásan hatékony mennyiségét tartalmazzák legalább egy találmány szerinti vegyületnek illetve farmakológiailag elfogadható sójának, adott esetben farmakológiailag elfogadható hordozó és/vagy adalékok mellett.

Ezek a készítmények különösen a fenti indikációkban alkalmazhatók, amikor azokat például parenterálisan, úgymint intravénásan, intrakután, szubkután vagy intramuszkulárisan.

A találmány a találmány szerinti új vegyületek és az azokat tartalmazó készítmények emberi vagy állati test profilaktikus vagy terápiás kezelésére való alkalmazására is vonatkoznak, különösen a fent említett szindrómák esetében, különösen a véralvadás emberi vagy állati testen kívül vagy belül történő gátlása esetében.

A dózis különösen a beadás meghatározott formájától és a terápia illetve a profilaxis céljától függ. Az egyes dózisok nagyságát és az adagolás rendjét a betegség minden egyes konkrét esetében egyedi döntéssel lehet a legjobban meghatározni. A szakember számára ismeretesek a releváns vérfaktorok meghatározási módszerei, amelyek erre a célra szolgálnak. Általában egy terápiásan hatékony mennyiségű találmány szerinti vegyület mennyisége injekció esetében a közelítően 0,005-0,1 mg/testsúlykg dózistartományba esik. A közelítően 0,01-0,05 mg/testsúlykg dózistartomány az előnyös. A beadás történhet intravénás, intramuszkuláris vagy szubkután injekcióban. Ennek megfelelően az egydózisos, parenterálisan alkalmazható gyógyszerkészítmény dózisonként a beadás módjától függően körülbelül 0,4-7,5 mg találmány szerinti vegyületet tartalmazhat. A hatóanyag mellett a gyógyszerkészítmények szokásosan tartalmazznak egy puffert, például egy foszfátpuffert, amely a pH-érték 3,5 és 7 között tartására szolgál, és nátrium-kloridot, mannitolt vagy szorbitolt az izotóniás oldat biztosítására. A készítmények lehetnek oldott vagy fagyasztva szárított alakban, az oldatok előnyösen tartalmazhatnak egy antibakteriálisan aktív tartósítószert, például 0,2-0,3% 4-hidroxi-benzoészav metil- vagy etilésztert.

A találmány másik kivitelezési formája olyan vizes készítmény, mely vizet, legalább egy találmány szerinti vegyületet és kalcium, magnézium vagy cink ionokat tartalmaz vizoldhatatlan só formájában. A vizoldhatatlan só előnyösen egy foszfát, mely igen oldhatatlan. Ennek a készítménynek a pH-ja 4-11, előnyösen 5-9 lehet. A fémsó koncentrációja 100 mM-600 mM, előnyösen 100 mM-300 mM, és legelőnyösebben körülbelül

150 mM. Ha a koncentráció magasabb, mint a fiziológiásan alkalmazható koncentráció, az oldat felhígítható használat előtt a fiziológiai koncentrációra. A találmány szerinti vegyületek koncentrációja 1-600 mg/ml, előnyösen 20-80 mg/ml lehet. Ha magas koncentráció van jelen, az hígítható 20-80 mg/ml tartományra használat előtt.

A vízoldhatatlan só részecskenagysága 10-30 μ m átmérő, előnyösen 10-20 μ m lehet.

E készítmény előállítható a találmány szerinti vegyületek vizes oldatában a vízoldhatatlan só in situ kicsapásával. Például a választott fém /Ca, Mg vagy Zn/ kloridját keverhetjük alkálifém-foszfáttal. A keletkező készítmény pH-ja ezután beállítható sósav vagy nátrium-hidroxid alkalmazásával. Az előnyös fém a cink. A találmány szerinti készítmények tartalmazhatnak cukrot is, például szukrózt, trehalózt vagy előnyösen manitolt.

A fent leírt készítmények mellett, melyek az emberi vagy állati testben való közvetlen orvosi alkalmazásra készültek, a jelen találmány azokra a gyógyszerkészítményekre is vonatkozik, melyeket az élő emberi vagy állati testen kívül alkalmaznak. Ilyen készítmények különösképpen a testen kívül keringésben vagy kezelésben alkalmazott vérhez adott antikoaguláns adalékok /például az extrakorporális keringtetés vagy a mesterséges vesében történő dialízis/ konzerválódik és módosítók /például vérszeparáció/. Az ilyen készítmények, mint törzsoldatok vagy egyetlen dózisformák hasonlóak összetételben a fent leírt injekciós készítményekhez, de a hatóanyag mennyisége és koncentrációja függ a kezelendő vér

térfogatától, pontosabban trombintartalmától. Ezzel kapcsolatban figyelembe kell vennünk, hogy a találmány szerinti hatóanyagok szabad formában ötszörös mennyiségű trombint deaktiválnak, ártalmatlanok fiziológiailag viszonylag nagy mennyiségben is, így a túladagolás nem veszélyes még például transzfúzió folyamán sem. Adott céltól függően a megfelelő dózis körülbelül 0,01-1,0 mg hatóanyag/liter vér, jóllehet a felső határ túlléphető kockázat nélkül.

A rajzok rövid leírása

A következő kísérleti részben a találmány különböző megvalósítási módjai kerülnek leírásra, hiavatkozással a kísérő rajzokra, melyekben:

az 1. ábra a Cys³³ HV1-Cys³³ HV1 dimerek újrachajtogatásának sematikus bemutatása.

KISÉRLETI ELJÁRÁSOK

Minden DNS-manipuláció - ha másképpen nincs megadva - standard műveleti leírások szerint történik /például: Maniatis, T. et al.: Molecular cloning: a laboratory manual. Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, New York, 1982/.

1. példa: pDP34/GAPFL-YHIR /CYS33/ plazmid létrehozása

A deszulfato-hirudin-Cys³³ - ami az 1 /HV1/ rekomináns deszulfato-hirudin mutánsa /J. Dodt et al., FEBS Lett. 165 /1984/, 180-184/, ahol a cisz-

teinnel helyettesítik az aszpartámsavat a 33-as helyen – élesztőben */Saccharomyces cerevisiae/* való kifejezését a deszulfato-hirudint kódoló nukleotid megváltoztatásával érték el. A módszer a polimeráz láncreakció /angol rövidítése: PCR/ /"PCR Protocols: A guide to methods and applications" M.A. Innis, D.H. Gelfand, J.J. Sninsky, T.J. White /eds./. Academic Press, New York, 1990/, melyet GAC helyettesítésére alkalmaztak TGT-vel a mutáns deszulfato-hirudint kifejező kazettában. A TGT ciszteint kódolja, és így a deszulfato-hirudin-Cys³³ /Cys³³ HV1/ kifejeződéséhez vezet.

A következő PCR primerek kerülnek alkalmazásra:

/SEQ ID NO:1,SEQ ID NO:2,SEQ ID NO:3,SEQ ID NO:4/

Kiegészítő a DNS templát

nukleotid pozícióihoz

/1/ 5'-TCGGTCGACGCTCTCCCTTATGCG-3'	7492-7494, 1-21
/2/ 5'-TTGGGTTCTTGTGGTGAAAAGAACCAATGTG-3'	626- 656
/3/ 5'-CTTTTCACCAACAAGAACCCAAGATACACTTG-3'	646- 616
/4/ 5'-GCCAAGCTTGGCTGCAGATTTTAATC-3'	1122-1100

Az oligodeoxinukleotid primerek komplementerek a nukleotid szekvenciákkal /lásd fent/ a pJDB207/GAPFL-YHIR /EP-A-340 170/ SEQ ID NO:5 templát DNS-ben. Az /1/ és /4/ primer a felfelé és lefelé irányuló primerek a templát DNS növelésében; a /2/ és /3/ primer belső primerek, melyek részben egymás komplementerei, és mindkettő a mutáció helyét fedi /aláhúzva/. A PCR /1/ és /3/ primer és a /2/ és /4/ primer párosával használatos külön-külön reakciókban a templát DNS részeinek erősítésében és a mutá-

ció bevezetésében. Mindkét PCR termék átfed a mutációs régióban. A második reakcióban mindkét termék elegyítésre és erősítésre kerül az /1/ és /4/ primerrel.

0,1 mg templát DNS-t a pJDB207/GAPFL-YHIR plazmidből /EP-A-340 170/ elegyítünk 1 mg /1/ és 1 mg /3/ primerrel vagy /2/ és /4/ primerrel a megfelelő DNS fragmensek erősítéséhez a standard PCR protokollok szerint /lásd fent/ 30 ciklust 1 percig alkalmazva a DNS szintézishez 72°C-on 10 sec a DNS szál szeparáláshoz 93°C és 20 sec a hőkezeléshez 50°C-on. A DNS fragmenseket fenolextrakcióval tisztítjuk és etanolban csapjuk ki.

A második átfedés-kiterjesztés reakció 0,1 mg-ot tartalmaz mindegyik PCR-termékből, melyet növeltünk az első reakcióban /lásd fent/ és 1 mg-ot minden /1/ és /4/ PCR primerből. 30 ciklus 1,5 perccel a DNS szintézishez 72°C-on, 20 sec a szálszeparáláshoz 93°C-on, és 40 sec a hőkezeléshez 50°C-on az alkalmazott körülmények.

A megnövelt DNS fragmenst restrikciónak vetjük alá Sali és HindIII-mal. Az 1,1 kb Sali-HindIII fragmenst Sali, HindIII hasító pUC9 /Sigma^R/ vektorba klónozzák. Restrikciós analízissel ellenőriznek számos klónt, és egyetlen helyes klón szekvenciáját megállapítják. Ennek a klónnak a kódoló szekvenciája tartalmazza a TGT kodont a Cys³³-hoz.

Az 1,1 kb Sali-HindIII inzert a mutáns deszulfato-hirudint kifejező kassetta, mely a 276 bp Sali-BamHI fragmenst pBR322-ből, a BamHI/BglIII elágazást és a 194 bp GAPFL promotort tartalmazza az EcoRI kapcsolóval az -5 helyzetben. Az EcoRI hely kapcsolja össze a promotort a PH05 kódoló

szekvenciaszignál szekvenciáját és a [Cys³³] HV1-et. A 3' terminális BamHI helyet követi a 377 bp PH05 transzkripció terminátor és egy Hind III hely.

Az 1.1 kb expressziós kazetta ugyanúgy klónozott mint a SalI tompa vég fragmens a pDP34 nagy másolatszámú élesztőkifejező vektorba /DSM 4473/, melyet Bam HI-vel és SalI-gyel hasítunk tompa véggé alakítva Klenow polimerázzal. A kapott plazmid jele pDP34/GAPFL-YHIR /CYS33/. A szekvenciák Cys³³ HV1 és a megfelelő fehérje esetében SEQ ID NO:7-ben és SEQ ID NO:8-ban vannak megadva.

2. példa: Élesztőtranszformáció és fermentáció

A Saccharomyces cerevisiae TR1456 törzset a 0341215 publikációs számú európai szabadalmi bejelentésben leírt módon hozzuk létre. A Saccharomyces cerevisiae H449 /DSM 4413/ jelű törzsből kiindulva két egymást követő kísérletsorozatban a két karboxipeptidázt /yscX és yscY/ eltávolítjuk a H449 törzsből az azokat kódoló KEX1 illetve PRC1 gének szétszakításával. Először az yscX -t kódoló KEX1 gént szakitjuk szét. Erre a célra a H449 törzset a KEX1 gént kódoló DNS fragmenssel transzportáljuk oda, ahol a KEX1 kódoló régió közepébe a teljes URA3 gén van beillesztve. Az uracil prototróf transzformánsokat szelektáljuk, és az ysc aktivitás hiányára vizsgáljuk. Ezután a KEX1 lukusznál beillesztett URA3 gént szakitjuk szét egy olyan plazmiddal végzett transzformációval, ahol a plazmid az URA3 gén szétszakított változatát ura3Δ5 tartalmazza /lásd EP-A-341 215/. Az uracil autotróf transzformánsokat szelektáljuk, és a

következő lépésben az endogén PRC1 karbopeptidáz yscY-t kódoló gént szakitjuk szét. A kísérletet teljesen a KEX1 szétszakításával analóg módon végeztük. A végül kapott izogén H449 származékot TR1456-tal jelöljük, melynek következő genotipusa van:

MATa, prb1, cps1, prc1::ura3, kex1::ura3, leu2-3,112, ura3 Δ 5, [cir⁰].

A TR 1456 jelű élesztőtörzset a pDP34/GAPFL-YHIR/CYS33/ plazmiddal transzformáljuk Hinnen et al. /Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 75 /1978/ 1929-1933/ protokolljában leírt módon. A transzformált élesztősejtek uracilszelekció alatt növekedhetnek. A kiválasztott élesztőkolóniát Saccharomyces cerevisiae TR 1456 /pDP34/GAPFL-YHIR/CYS33/-nak nevezzük.

A transzformánst két egymást követő előkultúrában uracilmentes 10 ml-es közegben szaporítjuk, tényleges fermentáció komplex közegben szelekció nélkül történik. A nyers [Cys³³]HV1-et izoláljuk a 340 170 publikációs számú európai szabadalmi bejelentésben leírt módon a táptalajból.

3. példa: Cys³³ HV1 előállítás, széthajtogatása és újrashajtogatása

[Cys³³]HV1-t élesztőben kifejezünk, és kiválasztjuk olyan közegbe, ahogyan az természetes hirudin esetében történik /Meyhack et al./1987/, Thromb. Res. Suppl., VII, 33/. A sejteket centrifugálással eltávolítjuk, és az antitrombin hatást mutató fehérjéket eltávolítjuk a felülúszóból XAD-7 gyantán való abszorpcióval. Az aktív fehérjék elegyét eluáljuk ammónium acetát pufferrel /0,2 M, pH=8,5/, és a Q-szefaróz gyorsáramú ioncserélő oszlopra visszük. Ezt az oszlopot ammónium formiát pufferrel /25 mM/ eluáljuk gradiens eluciót alkalmazva 0% A-tól /puffert pH=5,0-re

állítjuk hangyasavval/ 85% B-ig /a puffer pH=3,0-ra van állítva hangyasavval és 0,5 M nátrium-kloridot tartalmaz/ 50 perc alatt. A trombinaktivitást mutató frakciókat összegyűjtjük, és szárazra liofilizáljuk.

A nyers $[Cys^{33}]HV1$ -et /4 mg/ két órán át $23^{\circ}C$ -on redukáljuk 0,75 ml Tris-HCl pufferben, mely 5 M guanidin-hidrokloridot /GdmCl/ és 0,1 M ditiotreitolt tartalmaz. A mintát PD-10 töltetű oszlopon /Pharmacia/, mely 50 mM nátrium-hidrogénkarbonáttal /pH=8,3/ lett egyensúlyba hozva, bocsátjuk át. A redukált /denaturált/ mintát 1,2 ml térfogatban összegyűjtjük, és azonnal higitjuk ugyanazzal a nátrium-hidrogénkarbonát pufferrel a végső koncentrációra, 1 mg/ml-re /140 mM/. A hajtogatást $23^{\circ}C$ -on végezzük, és a hajtogatási intermediereket időszakosan "megfogjuk" a hajtogatási mintából vett aliquot mennyiségek 2 térfogatrész 4%-os trifluorecetsavas savanyítással.

4. példa: A hajtogatási intermedierek HPLC-jellemzése

$[Cys^{33}]HV1$ -et újjahajtogatunk 50 mM $NaHCO_3$ -mal /pH=8,3/ $23^{\circ}C$ -on /lásd 1. ábra/. A hajtogatás intermediereit megfogjuk a reakció során, és nagynyomású folyadékkromatográfiával a következő körülmények között elemezzük:

Oszlop: Vydac C-18 peptidekhez és fehérjékhez, 5 mm;

A oldat: 0,1% trifluorecetsavat tartalmazó víz;

B oldat: acetonitril/víz /9:1 térfogatarány/, mely 0,1% trifluorecetsavat tartalmaz;

Gradiens: 24%-tól 43% B oldatig lineárisan 20 percig;

Detektálás: 214 nm-en.

A redukált/denaturált /R/ Cys³³HV1 17,7 percnél eluálódik.

"NM" aktiv Cys³³HV1 monomer /13,5 perc/.

"ND" Cys³³HV1 dimer.

Az 1. ábrán a nyers [Cys³³]HV1 HPLC-s analizisének eredménye ugyanolyan HPLC-körülmények között.

A nyers termék heterogenitása a /bioszintézis utáni/ nem megfelelő hajtogatás vagy a tisztítás közben történő mintabomlás következménye.

Az aktiv [Cys³³]HV1 monomer /NM/ képződik először /1. ábra/ 0,05+/-0,01 perc⁻¹ elsőrendű sebességállandóval a leirt körülmények között. A Cys³³ oxidációja két aktiv [Cys³³]HV1 monomer között ezt követően fellép, és a dimer képződik. A hajtogatás nagyon hatékony, és a hozam magasabb 85-90%-nál. A 8,3-nél nagyobb pH-értéken a hajtogatási folyamat még gyorsabb.

5. példa: A [Cys³³] deszulfato-hirudin monomer és dimer jellemzése

Az aminosav-összetételt dimetil-amino-azobenzol-szulfonil-klorid /dabsyl/ módszerrel határozzuk meg /Chang et al. Anal. Biochem. /1991/, 197, 52-58./, ami lehetővé teszi a diszulfid-tartalom direkt mennyiségi meghatározását. Az aminosav-sorrend Applied Biosystem Inc. 470A protein szekvencerrel került meghatározásra. A deszulfato-hirudin származékok anti-trombin aktivitását a Chromozym TH /Boehringer Mannheim/ emésztéséből származó α -trombin működésének inhibíciójából határoztuk meg az előírt protokoll felhasználásával /Stone et al. Biochemistry /1986/, 25, 4622-4628; Chatrenet et al. J. Biol. Chem. /1992/, 267, 3038-3043/. A deszulfato-hirudin molekulásúlya 13916 lézerdeszorpciós ionizációs tömegspektrométerrel meghatározva saját építésű műszer felhasználásával

/Boernsen et al. Chimia /1990/, 44, 412-416/.

A $[\text{Cys}^{33}]_{\text{HV1}}-[\text{Cys}^{33}]_{\text{HV1}}$ dimer nem tartalmaz szabad ciszteint, amit meg lehet erősíteni aminosav-elemzéssel.

A trombininhibíció mérését 1 nM deszulfato-hirudin és 1,5 nM α -trombin koncentrációval kiviteleztek, a dimer azonos súlyarányoknál lényegében azonos inhibíciós hatást mutatott, mint a "vad" deszulfato-hirudin /82 $\pm$ 5%/.

6. példa: A dimer és a monomer kölcsönösen egymásba alakítható

A három deszulfato-hirudin belső szulfidtól eltérően a dimer $\text{Cys}^{33}-\text{Cys}^{33}$ kötése nem stabilizált nem kovalens kölcsönhatásokkal. Ezért lehetséges szelektíven szelektíven hasítani a $\text{Cys}^{33}-\text{Cys}^{33}$ kötést enyhe redukáló körülmények között a három aktív magrészben található diszulfid szétszakítása nélkül. Kísérleteket végeztünk, hogy megállapítsuk azokat az optimális körülményeket, amelyek lehetővé teszik a dimer kvantitatív átalakítását monomerré. Ez elérhető 0,5-2,5 mM β -merkaptóetanol szoba-hőmérsékleten. Magasabb β -merkaptóetanol koncentrációval a monomer gyorsan szétesik a $\text{Cys}^6-\text{Cys}^{14}$, $\text{Cys}^{16}-\text{Cys}^{28}$ és $\text{Cys}^{22}-\text{Cys}^{39}$ diszulfid kötések redukciójának következményeként.

7. példa: Deszulfato-hirudin dimert tartalmazó, parenterálisan alkalmazható gyógyszerkészítmény

A 3. példa szerinti liofilizált $[\text{Cys}^{33}]_{\text{HV1}}-[\text{Cys}^{33}]_{\text{HV1}}$ dimert 0,9%-os

konyhasó oldatban oldjuk 0,2 mg/ml vagy 2 mg/ml végső koncentrációig. Ezeket az oldatokat sterilizáljuk ultraszűrővel /0,22 μ m pórusú membránokon/.

A steril oldatok közvetlenül használhatók például intravénás beadásra.

8. példa: Szubkután adott hirudin HV1 és [Cys³³]HV1-[Cys³³]HV1 dimer hatása patkány plazmában ex vivo mért APTT-re

/APTT = activated partial thrombin time = aktivált részleges trombinidő/
A [Cys³³]HV1-[Cys³³]HV1 dimert fiziológiás sóoldatban 4,5 mg/ml koncentrációig oldjuk, és a nem modifikált hirudin monomert fiziológiás sóoldatban 3,0 mg/ml koncentrációig oldjuk /ezeket a dózisokat in vitro eredmények alapján választottuk ki, hogy hasonló hatást érjünk el APTT-n 1 óra alatt/. Az oldatokat szubkután adjuk a patkányoknak /1 ml/kg/. Az oldat beadása után különböző időpontokban 2 ml vért veszünk kardiális pungálással egy tized térfogatnyi 3,8 vegyes%-os trinátrium-citrát oldatba, és azonnal elvegyítjük őket. A kicsapódott vért 20 percig 2500 g-vel centrifugáljuk, hogy vérlemezkementes szérumot kapjunk.

A plazmamintákat APTT-re szokásos módszerekkel vizsgáljuk Instrumentation Laboratory ACL 300R koagulométerrel. Az APTT meghatározási módszernél az Instrumentation Laboratory ellagánsav tesztkészletet használjuk - 50 μ l plazmát ellagánsav aktiváló ágenssel /50 μ l/ inkubálunk 37°C-on 5 percig az 50 μ l 25 mM-os kalcium-klorid oldat használása előtt, és a plazmaalvadás idejét automatikusan rögzítjük, a végpontot optikailag a fény-szóródásból határozzuk meg a fibrinhálózat képződésekor /lásd 1.táblázat/.

1. táblázat

Idő	HV1	$[\text{Cys}^{33}] - [\text{Cys}^{33}] \text{HV1 dimer}$
0	1,00 $\pm$ 0,02	1,00 $\pm$ 0,02
1	2,44 $\pm$ 0,07	2,29 $\pm$ 0,08
4	1,43 $\pm$ 0,05	2,07 $\pm$ 0,25
6	0,95 $\pm$ 0,02	1,44 $\pm$ 0,02

Az eredmények a kontroll APTT átlagértékek többszöröseként vannak kifejezve, és átlag $\pm$ az átlag standard hibája /n=5/ alakban vannak megadva.

9. példa: Gyógyszerkészítmény

Az A oldat 2,43 M ZnCl_2 -t és 0,455 M Na_2HPO_4 -et tartalmaz, aminek pH-ja sósavval 2,5-re van állítva. A B oldat 0,6 M NaOH-t és 0,25 M NaCl-t tartalmaz. A C oldat két rész $[\text{Cys}^{33}] \text{HV1} - [\text{Cys}^{33}] \text{HV1 dimer}$ vizes törzsoldatból /80 mg/ml/ és 1,05 rész A oldatból áll /térfogatarány 2:1,05/. A készítményt viz, B oldat és C oldat elegyítésével kapjuk, ahol a súlyarány 0,66:0,1883:0,4.

Hasonló elegyeket állítunk elő úgy, hogy ZnCl_2 helyett CaCl_2 -t vagy MgCl_2 -t használunk.

10. példa: Gyógyszerkészítmény

Az A1 oldat 165mM ZnCl_2 -t, 2,11 mM Na_2HPO_4 -et és 37,8 mM HCl-ot tartalmaz vízben. A B1 oldat 0,6 N NaOH-t tartalmaz. $[\text{Cys}^{33}] \text{HV1} - [\text{Cys}^{33}] \text{HV1}$

dimert/por/ adunk 31,7 térfogatrész A1 oldathoz, azután 55 térfogatrész mannitol oldatot /198 mM/ és 13,3 térfogatrész B1 oldatot. Az oldat zavarossá válik a készítmény létrehőttekor. $[\text{Cys}^{33}]\text{HV1}-[\text{Cys}^{33}]\text{HV1}$ dimer kerül felhasználásra 20mg/ml vízben. A pH beállítása nem szükséges.

11. példa: Humán trombin inhibíció kinetikai paramétereinek meghatározása $[\text{Cys}^{33}]\text{HV1}-[\text{Cys}^{33}]\text{HV1}$ dimerrel

A hirudin koncentrációját 2,0 nM trombinnal szembeni titrálással határozzuk meg 200 μM D-Val-Leu-Arg-p-nitroanilid jelenlétében Wallace et al. módszerével /Biochemistry /1989/, 28, 10079-10084/.

Az egy alegységre vonatkozó hétezres molekulatömeg és súly alapján az aktiv molekulák reakciója 0,97. Ez az eredmény azt mutatja, hogy a dimerben mindkét molekula aktiv.

A $[\text{Cys}^{33}]\text{HV1}-[\text{Cys}^{33}]\text{HV1}$ dimer kinetikai paramétereit a Stone et al. /Biochemistry /1986/, 25, 4622-4628/ és Braun et al. /Biochemistry /1988/, 27, 6517-6522/ által leírt fejlődésgörbe-módszerrel határoztuk meg. Minden meghatározásnál a D-Phe-pipecolil-Arg-p-nitroanilidből a p-nitroanilin képződését követjük a hat mérés során, melyből egy az inhibitor távollétében, a többi pedig az inhibitor különböző koncentrációinál /10-60 pM $[\text{Cys}^{33}]\text{HV1}-[\text{Cys}^{33}]\text{HV1}$ dimer/ történik. A szubsztrátkoncentráció 100 μM és az enzimkoncentráció 20 pM.

A kinetikai paramétereket kétszer határoztuk meg, a 2. táblázatban megadott értékek a mért értékei súlyozott átlagai.

2. táblázat

Inhibitor	Paraméter	
	$10^8 k_1$ /M ⁻¹ s ⁻¹ /	K_1 /pM/
[Cys ³³]HV1-[Cys ³³]HV1 dimer	/0,51±0,03/	0,330±0,038
HV1	/1,37±0,03/	0,237±0,006

Mikroorganizmusok letétbe helyezése

A következő mikroorganizmus törzseket helyeztük letétbe a Német Mikro-
 organizmus Gyűjteményben /Deutsche Sammlung von Mikroorganismen /DSM/,
 Mascheroder Weg 1b, D-3300 Braunschweig/. A letétbe helyezések időpont-
 ja és a letétek száma:

Saccharomyces cerevisiae H449: 1988. február 18., DSM 4413;

Escherichia coli JM 109/pDP34: 1988. március 14., DSM 4473.

SZEKVENCIALISTA

/1/ ÁLTALÁNOS INFORMÁCIÓ:

/i/ BEJELENTŐ:

/A/ NÉV: CIBA-GEIGY AG

/B/ UTCA: Klybeckstr. 141

/C/ VÁROS: Basel

/E/ ORSZÁG: SVÁJC

/F/ POSTAI IRÁNYÍTÓSZÁM /ZIP/: 4002

/G/ TELEFON: +41 61 69 11 11

/H/ TELEFAX: +41 61 696 79 76

/I/ TELEX: 962 991

/A/ NÉV: UCP GENP-Pharma AG

/B/ UTCA: Solothurnerstrasse 24

/C/ VÁROS: Kirchberg

/E/ ORSZÁG: Svájc

/F/ POSTAI IRÁNYÍTÓSZÁM: 3422

/ii/ A TALÁLmány CIME: Nagy molekulatömegű hirudin

/iii/ SZEKVENCIÁK SZÁMA: 8

/iv/ SZÁMITÓGÉPES OLVASÁSI FORMA:

/A/ ADATHORDOZÓ TIPUSA: Floppy diszk

/B/ SZÁMITÓGÉP: IBM PC kompatibilis

/C/ OPERÁCIÓS RENDSZER: PC-DOS/MS-DOS

/D/ SOFTWARE: PatentIn Release 1.0, 1.25 verzió /EPO/

/2/ INFORMÁCIÓ AZ 1. AZONOSÍTÓSZÁMU SZEKVENCIÁHOZ:

/i/ SZEKVENCIAJELLEMZŐK:

/A/ HOSSZSÁG: 24 bázispár

/B/ TIPUS: nukleinsav

/C/ SZÁL: egyetlen

/D/ TOPOLOGIA: lineáris

/ii/ MOLEKULATIPUS: DNS /genomiális/

/ix/ JELLEMZŐK:

/A/ NÉV/KULCS: misc_feature

/B/ ELHELYEZÉS: 1..24

/D/ EGYÉB INFORMÁCIÓ: /termék= "Szintetikus PCR primer

/xi/ SZEKVENCIALEÍRÁS: SZEKVENCIAAZONOSÍTÓ SZÁM: 1:

TCGGTCGACG CTCTCCCTTA TGCG

/2/ INFORMÁCIÓ A 2. AZONOSÍTÓSZÁMU SZEKVENCIÁHOZ:

/i/ SZEKVENCIAJELLEMZŐK:

/A/ HOSSZSÁG: 31 bázispár

/B/ TIPUS: nukleinsav

/C/ SZÁL: egyetlen

/D/ TOPOLOGIA: lineáris

/ii/ MOLEKULATIPUS: DNS /genomiális/

/ix/ JELLEMZŐK:

/A/ NÉV/KULCS: misc_feature

/B/ ELHELYEZÉS: 1..31

/D/ EGYÉB INFORMÁCIÓ: /termék= "Szintetikus PCR primer"

/xi/ SZEKVENCIALEÍRÁS: SZEKVENCIAAZONOSÍTÓ SZÁM: 2:

TTGGGTTCTT GTGGTGAAAA GAACCAATGT G

/2/ INFORMÁCIÓ A 3. AZONOSÍTÓSZÁMU SZEKVENCIAHOZ:

/i/ SZEKVENCIAJELLEMZŐK:

/A/ HOSSZUSÁG: 31 bázispár

/B/ TIPUS: nukleinsav

/C/ SZÁL: egyetlen

/D/ TOPOLOGIA: lineáris

/ii/ MOLEKULATIPUS: DNS/genomiális/

/ix/ JELLEMZŐK:

/A/ NÉV/KULCS: misc_feature

/B/ ELHELYEZÉS: 1..31

/D/ EGYÉB INFORMÁCIÓ: /termék= "Szintetikus PCR primer"

/xi/ SZEKVENCIALEÍRÁS: SZEKVENCIAAZONOSÍTÓ SZÁM: 3:

CTTTTCACCA CAAGAACCCA AGATACACTT G

/2/ INFORMÁCIÓ A 4. AZONOSÍTÓSZÁMU SZEKVENCIÁHOZ:

/i/ SZEKVENCIAJELLEMZŐK:

/A/ HOSSZUSÁG: 26 bázispár

/B/ TIPUS: nukleinsav

/C/ SZÁL: egyes

/D/ TOPOLOGIA: lineáris

/ii/ MOLEKULATIPUS: DNS /genomiális/

/ix/ JELLEMZŐK:

/A/ NÉV/KULCS: misc_feature

/B/ ELHELYEZÉS: 1..26

/D/ EGYÉB INFORMÁCIÓ: /termék= "Szintetikus PCR primer"

/xi/ SZEKVENCIALEÍRÁS: SZEKVENCIAAZONOSÍTÓ SZÁM: 4:

GCCAAGCTTG GCTGCAGATT TTAATC

/2/ INFORMÁCIÓ AZ 5. AZONOSÍTÓSZÁMU SZEKVENCIÁHOZ:

/i/ SZEKVENCIAJELLEMZŐK:

/A/ HOSSZUSÁG: 1130 bázispár

/B/ TIPUS: nukleinsav

/C/ SZÁL: egyes

/D/ TOPOLÓGIA: lineáris

/ii/ MOLEKULATIPUS: DNS /genomiális/

/ix/ JELLEMZŐK:

/A/ NÉV/KULCS: misc_signal

/B/ ELHELYEZÉS: 1..276

/D/ EGYÉB INFORMÁCIÓ: /termék= "SalI -BamHI pBR322 fragmens"

/ix/ JELLEMZŐK:

/A/ NÉV/KULCS: misc_feature

/B/ ELHELYEZÉS: 277..284

/D/ EGYÉB INFORMÁCIÓ: /funkció= "BamHI/BglII kapcsoló"

/ix/ JELLEMZŐK:

/A/ NÉV/KULCS: promotor

/B/ ELHELYEZÉS: 285..478

/D/ EGYÉB INFORMÁCIÓ: /funkció= "CAPFL promotor"

/ix/ JELLEMZŐK:

/A/ NÉV/KULCS: misc_feature

/B/ ELHELYEZÉS: 479..484

/D/ EGYÉB INFORMÁCIÓ: /termék= "EcoRI kapcsoló"

/ix/ JELLEMZŐK:

/A/ NÉV/KULCS: misc_signal

/B/ ELHELYEZÉS: 488..538

/D/ EGYÉB INFORMÁCIÓ: /funkció= "PH05 szignálszekvencia"

/ix/ JELLEMZŐK:

/A/ NÉV/KULCS: mat_peptide

/B/ ELHELYEZÉS: 539..733

/D/ EGYÉB INFORMÁCIÓ: /termék= "Hirudin HV1"

/standard_név= "HV1"

/ix/ JELLEMZŐK:

/A/ NÉV/KULCS: terminátor

/B/ ELHELYEZÉS: 737..1113

/D/ EGYÉB INFORMÁCIÓ: /standard_név= "PH05 terminator"

/ix/ JELLEMZŐK:

/A/ NÉV/KULCS: misc_feature

/B/ ELHELYEZÉS: 1117..1122

/D/ EGYÉB INFORMÁCIÓ: /funkció= "M13 klónozó rész"

/ix/ JELLEMZŐK:

/A/ NÉV/KULCS: misc_signal

/B/ ELHELYEZÉS: 734..736

/D/ EGYÉB INFORMÁCIÓ: /funkció= "Fordító terminátor"

/standard_név= "TAG"

/xi/ SZEKVENCIALEIRÁS: SZEKVENCIAAZONOSÍTÓ SZÁM: 5:

GTCGACGCTC TCCCTTATGC GACTCCTGCA TTAGGAAGCA GCCCAGTAGT AGGTTGAGGC	60
CGTTGAGCAC CGCCGCCGCA AGGAATGGTG CATGCAAGGA GATGGCGCCC AACAGTCCCC	120
CGGCCACGGG GCCTGCCACC ATACCCACGC CGAAACAAGC GTCATGAGC CCGAAGTGCC	180
GAGCCCGATC TTCCCCATCG GTGATGTCGG CGATATAGGC GCCAGCAACC GCACCTGTGG	240
CGCCGGTGAT GCCGGCCACG ATGCGTCCGG CGTAGAGGAT CTCCTGAAA AAAAAGGTTG	300
AAACCAGTTC CCTGAAATTA TTCCCTACT TGAATAATA GTATATAAAG ACGGTAGGTA	360
TTGATTGTAA TTCTGTAAAT CTATTTCTTA AACTTCTTAA ATTCTACTTT TATAGTTAGT	420
CTTTTTTTTA GTTTTAAAC ACCAAGAACT TAGTTTCGAA TAAACACACA TAAATAAAGA	480
ATTCAAAATG TTAAATCTG TTGTTTATTC AATTTTAGCC GCTTCTTTGG CCAATGCAGT	540
TGTTTACACC GACTGTACCG AATCTGGTCA AAACCTGTGT TTGTGTGAAG GTTCTAACGT	600
TTGTGGTCAA GGTAACAAGT GTATCTTGGG TTCTGACGGT GAAAAGAACC AATGTGTTAC	660
CGGTGAAGGT ACCCCAAAGC CACAATCTCA CAACGACGGT GACTTCGAAG AAATCCCAGA	720
AGAATACTTG CAATAGGATC CTGGTACGTT CCTCAAGGTG CTCGTGTCTA CACCGAAAAA	780
TTCCAATGTT CTAACGACAC CTACGTCAGA TACGTCATTA ACGATGCTGT TGTTCGAATT	840
GAAACCTGTT CCACTGGTCC AGGGTTCTCT TGTGAAATCA ATGACTTCTA CGACTATGCT	900
GAAAAGAGAG TAGCCGGTAC TGAATTCCTA AAGGTCTGTA ACGTCAGCAG CGTCAGTAAC	960
TCTACTGAAT TGACCTTCTA CTGGGACTGG AACACTACTC ATTACAACGC CAGTCTATTG	1020
AGACAATAGT TTTGTATAAC TAAATAATAT TGGAACTAA ATACGAATAC CCAAATTTTT	1080
TATCTAAATT TTGCCGAAAG ATTAAAATCT GCAGCCAAGC TTTGAAGAAA	1130

/2/ INFORMÁCIÓ A 6. AZONOSÍTÓSZÁMU SZEKVENCIÁHOZ:

/i/ SZEKVENCIAJELLEMZŐK:

/A/ HOSSZUSÁG: 65 aminosav

/B/ TIPUS: aminosav

/C/ SZÁL: egyes

- 53 -

/D/ TOPOLOGIA: lineáris

/ii/ MOLEKULATIPUS: fehérje

/ix/ JELLEMZŐK:

/A/ NÉV/KULCS: fehérje

/B/ ELHELYEZÉS: 1..65

/D/ EGYÉB INFORMÁCIÓ: /jelzés= "1. hirudinváltozat /HV1/"

/xi/ SZEKVENCIALEÍRÁS: SZEKVENCIAAZONOSÍTÓSZÁM: 6:

Val	Val	Tyr	Thr	Asp	Cys	Thr	Glu	Ser	Gly	Gln	Asn	Leu	Cys	Leu	Cys
1				5					10					15	
Glu	Gly	Ser	Asn	Val	Cys	Gly	Gln	Gly	Asn	Lys	Cys	Ile	Leu	Gly	Ser
			20					25					30		
Asp	Gly	Glu	Lys	Asn	Gln	Cys	Val	Thr	Gly	Glu	Gly	Thr	Pro	Lys	Pro
			35				40					45			
Gln	Ser	His	Asn	Asp	Gly	Asp	Phe	Glu	Glu	Ile	Pro	Glu	Glu	Tyr	Leu
			50				55				60				
Gln															
65															

/2/ INFORMÁCIÓ A 7. AZONOSÍTÁSI SZÁMU SZEKVENCIAHOZ:

/i/ SZEKVENCIAJELLEMZŐK:

/A/ HOSSZUSÁG: 195 bázispár

/B/ TIPUS: nukleinsav

/C/ SZÁL: egyes

/D/ TOPOLOGIA: lineáris

/ii/ MOLEKULATIPUS: DNS /genomiális/

/ix/ JELLEMZŐK:

/A/ NÉV/KULCS: mat_peptide

/B/ ELHELYEZÉS: 1..195

/D/ EGYÉB INFORMÁCIÓ: /termék= "[33-Cys]HV1"

/xi/ SZEKVENCIALEÍRÁS: SZEKVENCIAAZONOSÍTÓSZÁM: 7:

GTTGTTTACA CCGACTGTAC CGAATCTGGT CAAAACTTGT GTTTGTGTGA AGGTTCTAAC	60
GTTTGTGGTC AAGGTAACAA GTGTATCTTG GGTTCCTGTG GTGAAAAGAA CCAATGTGTT	120
ACCGGTGAAG GTACCCCAAA GCCACAATCT CACAACGACG GTGACTTCGA AGAAATCCCA	180
GAAGAATACT TGCAA	195

/2/ INFORMÁCIÓ A 8. AZONSÍTÁSI SZÁMU SZEKVENCIAHOZ:

/i/ SZEKVENCIAJELLEMZŐK:

/A/ HOSSZUSÁG: 65 aminosav

/B/ TIPUS: aminosav

/C/ SZÁL: egyes

/D/ TOPOLOGIA: lineáris

/ii/ MOLEKULATIPUS: fehérje

/ix/ JELLEMZŐK:

/A/ NÉV/KULCS: fehérje

/B/ ELHELYEZÉS: 1..65

/D/ EGYÉB INFORMÁCIÓ: /jelzés= "[33-Cys]HV1"

/xi/ SEKVENCIALEÍRÁS: SEKVENCIAAZONOSÍTÓ SZÁM: 8:

Val Val Tyr Thr Asp Cys Thr Glu Ser Gly Gln Asn Leu Cys Leu Cys
1 5 10 15

Glu Gly Ser Asn Val Cys Gly Gln Gly Asn Lys Cys Ile Leu Gly Ser
20 25 30

Cys Gly Glu Lys Asn Gln Cys Val Thr Gly Glu Gly Thr Pro Lys Pro
35 40 45

Gln Ser His Asn Asp Gly Asp Phe Glu Glu Ile Pro Glu Glu Tyr Leu
50 55 60

Gln

65

Szabadalmi igénypontok:

1. Kettőtől négy deszulfato-hirudin muteinből vagy ezek származékaiból álló, hirudinaktivitást mutató csoportot tartalmazó konjugátum, ahol a konjugátum nem fúziós protein, és a hirudinaktivitást mutató deszulfato-hirudinok vagy származékaik nincsenek glutáraldehiden vagy karbodiimiden keresztül összekapcsolva.
2. Az 1. igénypont szerinti két, hirudinaktivitás mutató deszulfato-hirudin mutein vagy származékai maradékából álló konjugátum.
3. Az 1. igénypont szerinti két, hirudinaktivitást mutató, HV1, HV2 vagy HV3/PA/ deszulfato-hirudin mutein vagy származék maradékából álló konjugátum.
4. Az 1. igénypont szerinti, hirudinaktivitást mutató, két HV1 deszulfato-hirudin mutein vagy származék maradékából álló konjugátum.
5. Az 1. igénypont szerinti konjugátum, ahol a deszulfato-hirudinok vagy deszulfato-hirudin származékok közvetlenül vagy egy összekötő csoporton keresztül kapcsolódnak.
6. Az 1. igénypont szerinti konjugátum, ahol a hirudinaktivitást mutató deszulfato-hirudin muteinekben vagy származékokban két cisztein kapcsolódik közvetlenül vagy egy kapcsoló csoporton keresztül.
7. Az 1. igénypont szerinti konjugátum, ahol a deszulfato-hirudin mutei-

nek vagy származékok közvetlenül diszulfid kötésen át kapcsolódnak.

8. Az 1. igénypont szerinti konjugátum, ahol két deszulfato-hirudin mutein vagy származék monomerjei vagy a deszulfato-hirudin mutein vagy származék monomerje és a kapcsoló csoport az N-terminális doménon belül vannak összekapcsolva.
9. Az 1. igénypont szerinti konjugátum, ahol a két deszulfato-hirudin mutein vagy származékmonomerjei vagy a deszulfato-hirudin mutein vagy származék monomerje és a kapcsoló csoport az aminosav-maradékok 5 és 70 közötti régiójában vannak összekapcsolva.
10. A 9. igénypont szerinti konjugátum, ahol a két deszulfato-hirudin mutein vagy származék monomerjei vagy a deszulfato-hirudin mutein vagy származék monomerje és a kapcsoló csoport a 30 és 40 közötti aminosav-maradék régióban van összekapcsolva.
11. Az 1. igénypont szerinti konjugátum, amely olyan deszulfato-hirudinkat tartalmaz, melyben egy vagy több aminosav egy vagy több kereszt-kötést képezni tudó csoporttal van helyettesítve.
12. A 11. igénypont szerinti konjugátum, mely olyan deszulfato-hirudinkat tartalmaz, ahol a deszulfato-hirudin egy aminosavát olyan aminosavval helyettesítik, mely az aszpartámsavból, glutaminsavból, lizinből és ciszteinből álló csoportból került kiválasztásra.
13. A 12. igénypont szerinti konjugátum, mely olyan deszulfato-hirudint

tartalmaz, ahol egy aminosavat cisztein helyettesít.

14.A 13. igénypont szerinti konjugátum, mely két olyan HV1 deszulfato-hirudinból áll, ahol Asp³³-at Cys helyettesíti.

15.Hirudinaktivitással rendelkező deszulfato-hirudin mutein vagy származék, mely képes kereszt kötéssel egy másik, hirudinaktivitással rendelkező deszulfato-hirudin muteinhoz vagy származékhoz kapcsolódni, az 5. igénypont szerint.

16.HV1 deszulfato-hirudin, ahol Asp³³-at Cys helyettesíti /SZEKVENCIA-AZONOSÍTÓ SZÁM: 8/.

17.Eljárás az 1. igénypont szerinti konjugátum előállítására, mely

- a megfelelő deszulfato-hirudin megfelelő gazdaszervezetben történő kifejezéséből,
- a deszulfato-hirudin izolálásából,
- ha szükséges, a reaktív aminosav oldalláncok védéséből,
- a deszulfato-hirudin megfelelő kapcsolóelemhez való kapcsolásából vagy két deszulfato-hirudin közvetlen összekapcsolásából áll.

18.A 17. igénypont szerinti eljárás, ahol a deszulfato-hirudint diszulfid kötésen keresztül kapcsolják.

19.A 18. igénypont szerinti eljárás, ahol a deszulfato-hirudinok nem összehajtottak és izolálás után újrarahajtogatottak.

20. Eljárás deszulfato-hirudin denaturálására és biológiailag aktiv polimer vagy dimer formává való renaturálására, mely
- kaotróp ágenssel a fenti módon definiált deszulfato-hirudin denaturálásból,
 - újrahajtogatási feltételek mellett a deszulfato-hirudin renaturálásából és
 - a deszulfato-hirudinek kapcsoló elemmel vagy közvetlenül való összekapcsolásából áll.
21. Az 1. igénypont szerinti vegyület és szokásos hordozók alkalmazása gyógyszerkészítmények előállítására.
22. Az 1. igénypont szerinti kettő-négy deszulfato-hirudin mutein vagy származékmaradékból álló konjugátumot tartalmazó gyógyszerkészítmény vagy amely nevezett vegyületeket szokásos segédanyagokkal, tipikusan hordozó és hígító segédanyagokkal együtt tartalmazza.
23. Vizes készítmény, mely vizet, egy 1. igénypont szerinti vegyületet és vizoldhatatlan só formájában kalcium, magnézium vagy cink ionokat tartalmaz.
24. A 23. igénypont szerinti készítmény, ahol a vizoldhatatlan só foszfát.
25. A 23. igénypont szerinti készítmény, ahol a fémsó koncentrációja 100 mM-600 mM.
26. A 23. igénypont szerinti készítmény, ahol az 1. igénypont szerinti

vegyület koncentrációja 1-600 mg/ml.

27. A 23. igénypont szerinti készítmény, ahol a vizoldhatatlan só részecskemérete 10-30 μ m átmérő.
28. Az 1. igénypont szerinti konjugátum alkalmazása emberi vagy állati test gyógyító vagy megelőző kezelésére.
29. A 28. igénypont szerinti konjugátum trombininhibicióra.
30. Gyógyszerkészítmény, mely terápiásan hatásos mennyiségű, legalább egy, 1. igénypont szerinti konjugátumot vagy ennek gyógyászatilag elfogadható sóját tartalmazza trombózis vagy embólia terápiájára vagy megelőzésére.
31. Expressziós vektor, mely expressziós kazettát tartalmaz a 15. igénypont szerinti deszulfato-hirudinhoz, ami egy szignálpeptidet kódoló első DNS szekvenciához működőképesen kapcsolt promotorból, mely a megfelelő olvasó vázban kapcsolódik a második DNS szekvenciához, ami kódolja a szóbanforgó deszulfato-hirudin muteint vagy származékot, és egy, a transzkripció befejezés jeleit tartalmazó DNS szekvenciából áll.
32. A 31. igénypont szerinti expressziós kazetta, ahol a promotor GAPFL vagy CUP1 promotor.
33. A 31. igénypont szerinti expressziós kazetta, ahol a jelző szekven-

cia a PH05 jelző szekvencia.

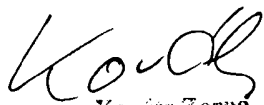
34. A 31. igénypont szerinti expressziós kazetta, ahol a deszulfato-hirudin mutein vagy származék $[\text{Cys}^{33}]_{\text{HV1}}$ /SZEKVENCIAAZONISÍTÓ SZÁM: 7/.

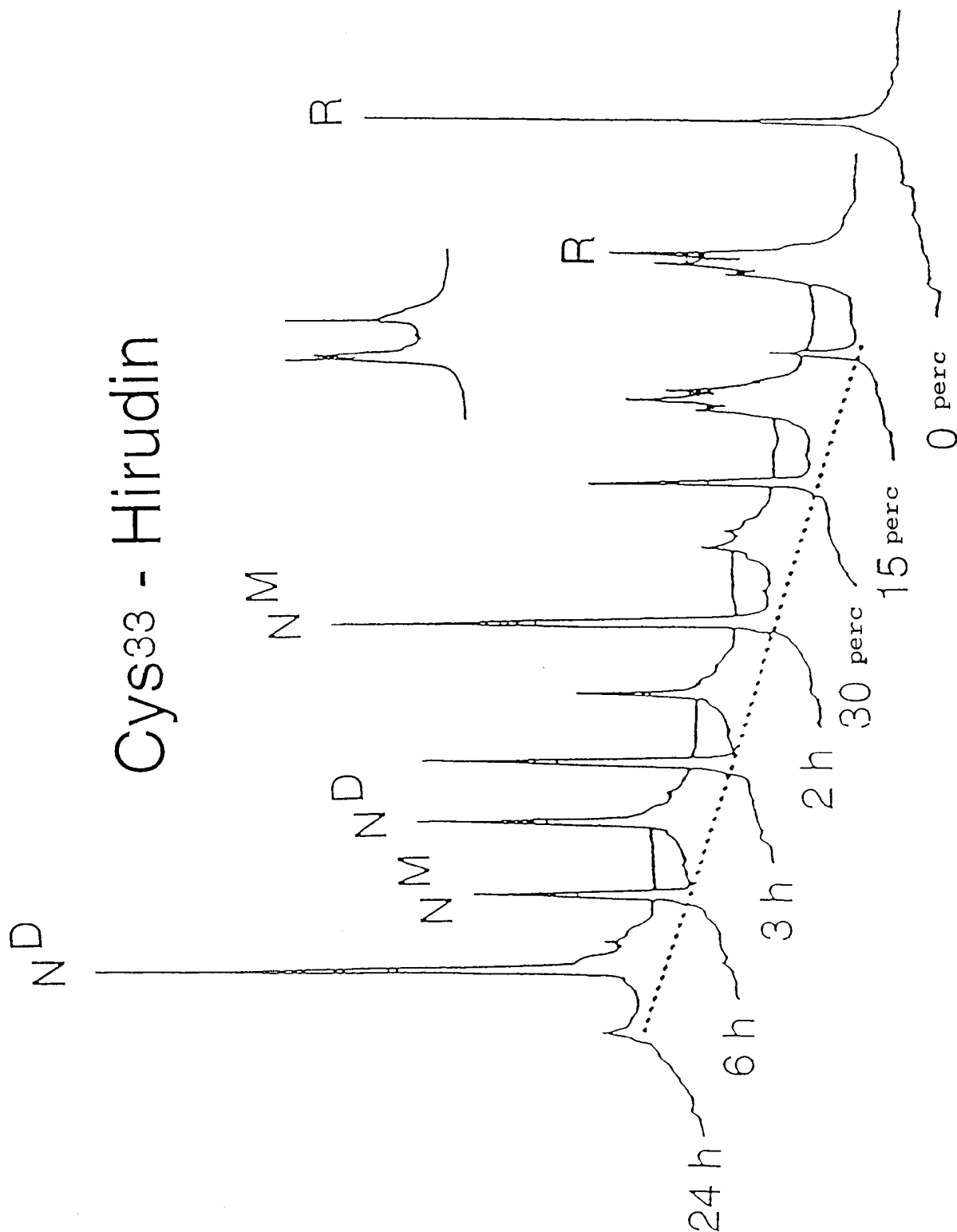
35. A 31. igénypont szerinti expressziós kazetta, ahol a terminátor a PH05 terminátor.

61. oldal
+ 1. oldal

62. oldal
Juli

A meghatalmazott


Kovács Zoltán
vezető igazgató
a Magyar Államkassza Igazgatósága
Előzetes Igazgatóság
H-1051 Budapest, József körút 113.
Telefon: 34-24-930, Fax: 34-24-323



1. ÁBRA